

Instituto Politécnico Nacional

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología

INFORME TECNICO DE LA OPCION CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**Disrupciones citogenéticas presentes en las horas
iniciales de la germinación de semillas de maíz
envejecidas artificialmente.**

Que para obtener el Título de Ingeniero Biotecnólogo

Presenta

JUAN ALBERTO GAYOSSO HERNÁNDEZ

**DIRECTOR DE PROYECTO:
Dr. GERMÁN F. GUTIÉRREZ H.**



México, D.F. Mayo 2007

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer profundamente el apoyo en todo sentido de mis padres y hermanos. Es difícil imaginar cómo sería el andar cotidiano sin recordar su comprensión, su apoyo inmenso y su amor.

Los sabios consejos del Dr. Germán F. Gutiérrez, quien ha venido guiando desde hace un año mi formación no solamente académica, sino como persona. Gracias por tener la paciencia ante mis dudas de novato y por escuchar atentamente los problemas que a lo largo del proyecto surgieron.

Gracias a mi hermanita Martha Gayosso, tú me enseñaste a ponerle muchas ganas a la escuela en un momento importante de mi formación

Un Agradecimiento muy especial a mi cuñado Edén López Santillán, por todo su apoyo incondicional.

Como olvidar la sonrisa, el entusiasmo y la sincera amistad de Melisa Medel, que formo parte de este proyecto.

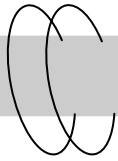
Quiero dar las gracias a la Dra. Ma. Del Carmen Oliver que revisó con paciencia este trabajo.

DEDICATORIA

*Este trabajo y todo lo que yo hago en la vida
esta dedicado a la persona que más respeto y
admiro.*

Mi Padre

Ramón Gayosso Luna



RESUMEN

Cuando las semillas están expuestas a un almacenamiento inadecuado o cuando la edad de la semilla es avanzada; el daño más frecuente es la pérdida de vigor, por lo que el estudio del proceso de envejecimiento de las semillas y en particular del maíz, resulta crucial para evaluar los rendimientos unitarios de este cultivo primordial para la dieta de los mexicanos, ya que semillas de alta calidad son esenciales para alcanzar una alta productividad.

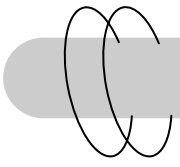
El objetivo del presente trabajo fue hacer una recopilación de información y estandarizar las técnicas citogenéticas de Índice de Cromátidas Hermanas (ICH) y ensayo cometa para células vegetales. Procedimientos utilizados para evaluar disrupciones citogenéticas y que son de difícil aplicación en células vegetales. Para tal efecto se observaron las alteraciones citogenéticas suscitadas a nivel radicular durante el periodo de germinación de semillas de maíz sometidas a tratamientos de envejecimiento acelerado.

Se aplicaron tratamientos de envejecimiento acelerado (**Calor Húmedo**, 41°C, 100% de humedad relativa, 72 hrs. y **Calor Seco**, 60°C, 48 Hrs.) a dos variedades de maíz denominados San José y San Josecito; esto nos permitió simular los daños metabólicos acumulados en las semillas durante su almacenamiento y aquellos ocasionados por la edad, resultando que la variedad San José tiene una mayor resistencia a los tratamientos de envejecimiento al no verse estadísticamente disminuida en la formación de PN.

Se realizó un estudio minucioso del ciclo celular en semillas de maíz envejecidas artificialmente de la variedad cocotitlan y cuijingo ; el estudio del ciclo celular nos permitió eliminar el factor del azar y utilizar criterios objetivos para la toma de las muestras ubicando el preciso momento en el cual los cromosomas presentan su mayor grado de condensación que por lo general es una etapa breve del ciclo celular (metafase mitótica).

Los resultados obtenidos en el estudio del ciclo celular permitieron determinar este período (mitosis) estableciendo la mejor hora para la prefijación con inhibidores a la 14 hr (IM = 16%).

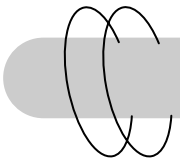
Los daños en el DNA fueron evidenciados con el ensayo cometa, esta es una prueba con una sensibilidad que supera en más de 100 veces a las pruebas citogenéticas y que permite detectar roturas de cadena simple. Los resultados mostraron que para tener buenos testigos la cantidad de muestra debe de ser al menos de 50µl para poder observar núcleos aislados.



CONTENIDO

	<i>Pág.</i>
LISTA DE TABLAS	V
LISTA DE FIGURAS	V
RESUMEN	II
1. MARCO TEÓRICO	9
1.1. Origen del maíz	9
1.2. Estructura del grano de maíz	10
1.3. IMPORTANCIA DEL MAÍZ	11
i) Producción mundial de Maíz	11
ii) Rendimiento promedio de maíz	11
iii) Producción e importación de maíz en México	12
1.4. TÉCNICAS CITOGÉNÉTICAS VENTAJAS Y APLICACIONES	13
i) Ensayo Cometa	13
ii) Índice de Cromátides Hermanas (ICH)	14
1.5. CITOGÉNÉTICA DEL MAÍZ	15
1.6. CICLO CELULAR	16
ii) Fases del ciclo celular	17
1.7. ENVEJECIMIENTO NATURAL	18
i) Almacenamiento de las semillas	18
ii) Efectos negativos del almacenamiento.....	19

	<i>Pág.</i>
1.7. ENVEJECIMIENTO ARTIFICIAL	19
i) Técnica del envejecimiento acelerado	19
ii) Envejecimiento acelerado tratamientos	20
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVOS	21
3.1. OBJETIVO GENERAL	21
ii) Metas	21
4. METODOLOGÍA	22
4.1. DIAGRAMA EXPERIMENTAL	22
i) Envejecimiento artificial	22
ii) Índice de Cromátides Hermanas (ICH)	23
iii) Ensayo cometa “extracción de núcleos”	25
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	26
i) Envejecimiento artificial	26
ii) Índice de Cromátides Hermanas (ICH)	26
iii) Ensayo cometa “extracción de núcleos”	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
i) Envejecimiento artificial	35
ii) Técnica de Aplastamiento o squash	41
iii) Índice de Cromátides Hermanas (ICH)	42
iv) Ensayo Cometa	45
6. CONCLUSIONES	46
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
8. ANEXO I “Preparación de Reactivos”	49



LISTA DE TABLAS

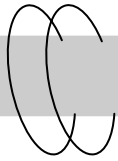
	<i>Pág.</i>
TABLA 1 Número de cromosomas en varias especies de la tribu <i>Maydeae</i>	15
TABLA 2. Resultados de la prueba de Tukey para PN	37
TABLA 3. Resultados de la prueba de Tukey para PA	38
TABLA 4. Resultados de la prueba de Tukey para SM	39
TABLA 5 Determinación de los Índices de Fase (IF) e Índices Mitóticos (IM)	44

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Origen del Maíz	10
Fig. 2 Estructura del grano de maíz	10
Fig. 3 Principales países productores a nivel mundial 2001.	11
Fig. 4. Rendimiento de los principales países productores a nivel mundial	11
Fig. 5 Producción y consumo nacional de maíz (1994-2004)	12
Fig. 6 Aplicaciones del Ensayo Cometa	13
Fig. 7 Aplicaciones de ICH	14
Fig. 8 Ciclo Celular	16
Fig. 9 Fases del ciclo celular.	17
Fig. 10 Almacenamiento de semillas	18
Fig. 11 Calor Húmedo y Testigos	20
Fig. 12 Calor Seco y Testigos	20
Fig. 13 Análisis del Ciclo celular.....	44

ABREVIATURAS

- ABN** : Alfa-bromonaftaleno
- CH** : Calor Húmedo.
- CS** : Calor Seco.
- CME** : Cuadrado medio de error.
- GL** : Grados de Libertad.
- ICH** : Índice de Cromátidas Hermanas.
- IM** : Índice Mitótico.
- IF** : Índice de Frecuencia.
- LPMA** : Agarosa de bajo punto de fusión.
- NPMA** : Agarosa de punto de fusión normal.
- PN** : Plántula Normal.
- PA** : Plántula Anormal.
- PMSF**: Fluoruro de fenil metil sulfonilo
- SM** : Semilla Muerta.
- T** : Testigo



1. MARCO TEÓRICO

Las monocotiledóneas son plantas de vital importancia en la alimentación de la humanidad. De éstas, las gramíneas que incluyen a los cereales, constituyen la fuente de alimento más importante.

Un ejemplo es el maíz, que en nuestro país es el cereal de mayor consumo. Por ello es fundamental conocer a fondo los mecanismos bioquímicos que actúan durante la germinación de maíz y que permiten el establecimiento de la plántula. El conocimiento profundo de este proceso permitirá diseñar estrategias para aumentar la productividad de este cultivo.

El maíz, que es junto con el trigo y el arroz uno de los cereales más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales y es una materia prima básica de la industria de transformación, con la que se producen almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco, combustible. La planta tierna, empleada como forraje, se ha utilizado con gran éxito en las industrias lácteas y cárnicas y, tras la recolección del grano, las hojas secas y la parte superior, incluidas las flores, aún se utilizan hoy en día como forraje para los rumiantes.

Botánicamente, el maíz (*Zea mays*) pertenece a la familia de las gramíneas, es una planta anual alta dotada de un amplio sistema radicular fibroso. Se trata de una especie que se reproduce por polinización cruzada y la flor femenina (elote, mazorca, choclo o espiga) y la masculina (espiga) se hallan en distintos lugares de la planta. Las panojas a menudo, una por tallo son las estructuras donde se desarrolla el grano, en un número variable de hileras (12 a 16), produciendo de 300 a 1 000 granos, que pesan entre 190 y 300 g por cada 1 000 granos. El peso depende de las distintas prácticas de cultivo. El grano constituye aproximadamente el 42 por ciento del peso en seco de la planta. El maíz es a menudo de color blanco o amarillo, aunque también hay variedades de color negro, rojo y jaspeado. Hay varios tipos de grano, que se distinguen por las diferencias de los compuestos químicos almacenados en él.

1.1. ORIGEN DEL MAÍZ

El cultivo del maíz tuvo su origen en México (FIG. 1), de donde se difundió hacia Canadá y Argentina. La evidencia más antigua de la existencia del maíz, de unos 7 000 años de antigüedad, ha sido encontrada por arqueólogos en el valle de Tehuacán (México) pero es posible que hubiese otros centros secundarios de origen en América. Este cereal era un artículo esencial en las civilizaciones maya y azteca y tuvo un importante papel en sus creencias religiosas, festividades y nutrición; ambos pueblos incluso afirmaban que la carne y la sangre estaban formadas por maíz.



FIG. 1. Origen del Maíz.

1.2. ESTRUCTURA DEL GRANO DEL MAÍZ

Los granos de maíz se desarrollan mediante la acumulación de los productos de la fotosíntesis, la absorción a través de las raíces y el metabolismo de la planta de maíz en la inflorescencia femenina denominada espiga. Esta estructura puede contener de 300 a 1 000 granos según el número de hileras y el diámetro y longitud de la mazorca. El peso del grano puede variar mucho, de aproximadamente 19 a 30 g por cada 100 granos. Durante la recolección, las panojas de maíz son arrancadas manual o mecánicamente de la planta. Se pelan las brácteas que envuelven la mazorca y luego se separan los granos a mano o, más a menudo, mecánicamente.

Corte Transversal de un Grano de Maíz

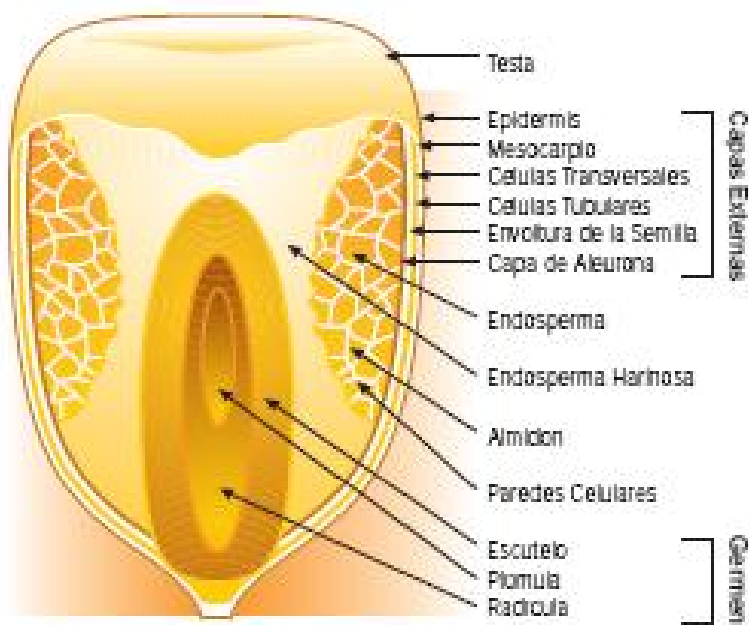


FIG. 2. Estructura del grano de Maíz

En la figura se muestran también las cuatro estructuras físicas fundamentales del grano: el pericarpio, cáscara, o salvado; el endospermo; el germen o embrión; y la piloriza (tejido inerte en que se unen el grano y el carozo).

1.3. IMPORTANCIA DEL MAÍZ

1.3.1. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE MAÍZ

La producción mundial de maíz amarillo duro para el año 2001 fue de 604 millones de toneladas (La FAO considera en estas cifras la producción de maíz amarillo para consumo humano y animal y maíz blanco por lo que los resultados derivados de este análisis a nivel mundial está referido al maíz en general) siendo Estados Unidos (40 %) uno de los primeros países productores, seguido de China (18 %) , Brasil (7 %) , Francia (3%) , México (3 %) , Argentina (2 %) y otros países (27%) FIG. 3.

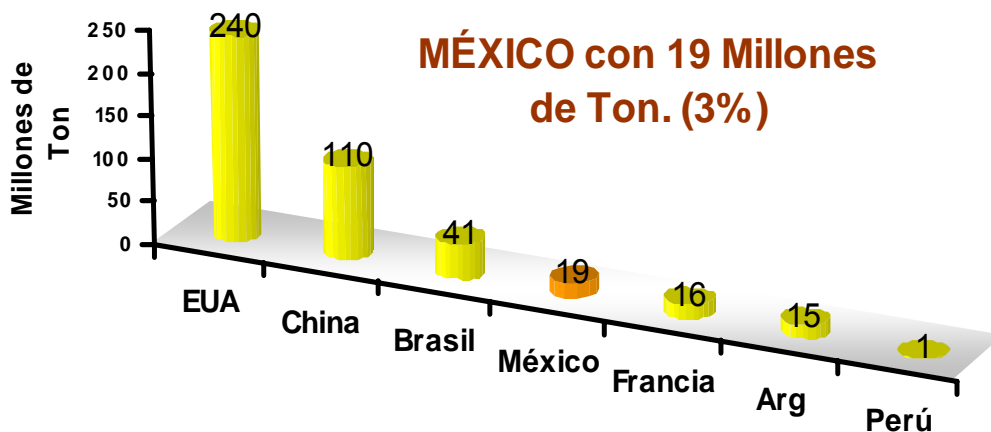


Fig. 3 Principales países productores a nivel mundial 2001.
FAO

1.3.2. RENDIMIENTOS PROMEDIO DE MAÍZ POR HECTÁREA

Los rendimientos promedios de maíz por hectárea en el mundo de los seis primeros países productores de este grano para el año 2001, ha sido de 8,664 kg/ha para Francia seguido por EEUU con 8,554 kg/ha, Argentina 5,592 kg/ha, China 4,703 kg/ha, Brasil 3,352 kg/ha y México con 2,557 kg/ha respectivamente. El rendimiento promedio mundial de maíz para el año 2001 ha sido de 4,383 kg/ha (FIG. 4.).

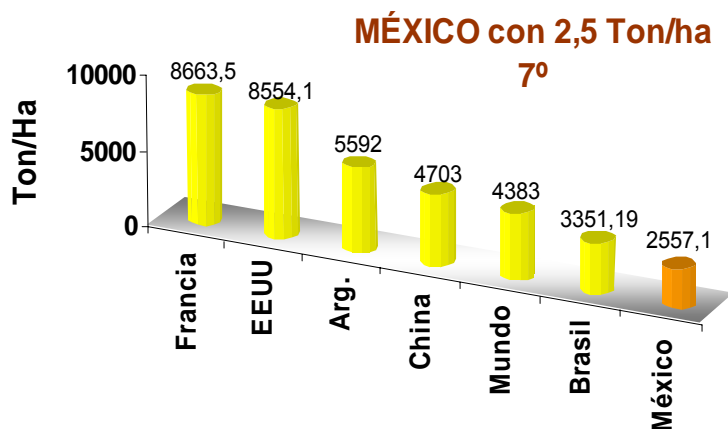


Fig. 4. Rendimiento de los principales países productores de maíz blanco a nivel mundial.

En la figura se muestran los mejores rendimientos logrados por los países que se citan, son debido al uso de fertilización oportuna; en las cantidades requeridas por las plantaciones que les permite reducir costos de producción con respecto a los otros países productores.



Los precios con el cual se ha estado importando el maíz en el mundo en el año 2001 a los principales países importadores a sido a 130 US\$/ton promedio mundial, pero algunos países han importado por debajo a este precio entre ellos se encuentra el Perú.

La competitividad del maíz importado se encuentra dado fundamentalmente por las condiciones climáticas y de suelo así como por la estructura agraria caracterizada por siembras en grandes extensiones, los niveles tecnológicos alcanzados en especial, empleo de semillas mejoradas, empleo intensivo de fertilizantes y manejos adicionales de otras variables que les permiten economías de escala que le suman altas productividades; a todo lo anterior se deberá agregar además, los niveles de subsidios que los países desarrollados aplican a sus productos, un ejemplo claro son los EEUU en el que el nivel de subsidio en 1991 fue de 7 mil millones de dólares.

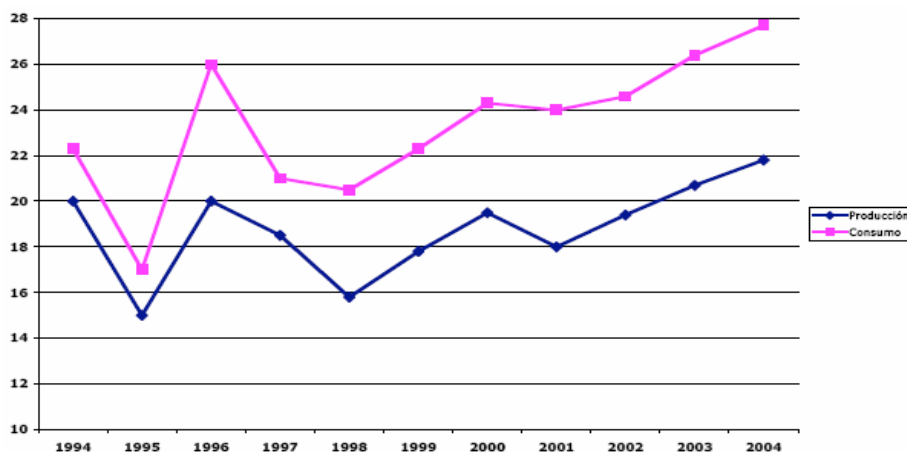
1.3.3. PRODUCCIÓN E IMPORTACIÓN DEL MAÍZ EN MÉXICO

El maíz es el cultivo más importante de México por varias razones: se producen alrededor de 18.2 millones de toneladas en una superficie de 8.5 millones de hectáreas y es el que presenta un mayor número de productores, 3.2 millones, en su mayoría ejidales (solo existen 4 millones de productores agrícolas en el país).

Alrededor del 90 % de la producción es de maíz blanco y se destina al consumo humano.

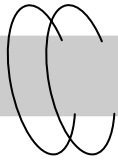
Existen dos tipos de productores de maíz:

- El primer grupo, donde se encuentra la mayoría (92 % de los productores), posee predios entre cero y cinco hectáreas y aportan el 56.4 % de la producción total. En general más de la mitad de su producción se destina al autoconsumo 52 %. Sus rendimientos fluctúan entre 1.3 y 1.8 toneladas por hectárea.
- El segundo grupo solo está el 7.9 % de los productores, con predios arriba de cinco hectáreas por productor y aportan el 43.6 % de la producción. Sus rendimientos van de 1.8, a 3.2 toneladas por hectárea. Únicamente destinan el 13.55 % de su producción al autoconsumo.



Fuente: SICM/SE y SEA/SAGARPA

Fig. 5 Producción y consumo nacional de maíz (1994-2004)



1.4. TÉCNICAS CITOGÉNÉTICAS VENTAJAS Y APLICACIONES

1.4.1. ENSAYO COMETA

El Ensayo Cometa, también conocida como electroforesis Alcalina de Células Individuales (SCG: Single Cell Gel Electrophoresis Assay), es una prueba que evalúa el daño del material genético causado por diferentes agentes químicos y físicos, puede ser realizado bajo condiciones neutras, detectando rupturas de doble cadena del ADN, o bajo condiciones alcalinas, detectando rupturas de simple cadena del ADN y sitios álcali lábiles.

En esta técnica, las células son embebidas en un gel de agarosa en un portaobjetos, sometidas a lisis alcalina o neutra y luego corridas por electroforesis durante un corto tiempo bajo condiciones alcalinas ($\text{pH} > 13$) o neutras ($\text{pH}=8,4$). El ensayo del cometa sobre condiciones alcalinas, fue introducido por Sing y colaboradores en 1988. Es una técnica electroforética sensible, reproducible, simple y de gran utilidad en monitoreo en poblaciones humanas expuestas a radiaciones y a diversas sustancias mutagénicas.

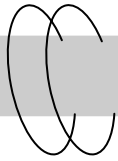
Las ventajas de esta técnica incluyen:

- (a) Los datos son colectados al nivel de células individuales, proveyendo información de la distribución intercelular del daño y de la reparación.
- (b) Se requieren sólo pequeños números de células (unos pocos miles)
- (c) Virtualmente cualquier población de células eucariotas puede ser utilizada.



Fig. 6. Aplicaciones de la técnica de Ensayo Cometa.

Esta prueba es ampliamente utilizada en disciplinas científicas como la toxicología genética, el bio-monitoreo ambiental, la investigación clínica y la epidemiología molecular.



1.4.2. INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS

El Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) es el intercambio simétrico y recíproco entre las dos cromátides de un cromosoma en loci aparentemente homólogos. Estos intercambios, que se detectan en preparados citológicos de cromosomas metafásicos representarían un evento natural de recombinación mitótico que se presenta en células normales con una frecuencia de 5-10/célula.

El ensayo de ICH se efectúa en un amplio numero de sistemas “in vitro” e “in vivo”; en todos los casos se induce en los cromosomas una coloración diferencial de las cromátides hermanas, para poder distinguir cada una de ellas y hacer visible los intercambios que ocurran. La coloración diferencial de las cromátidas se logra con la incorporación en los cromosomas del análogo de la timina, el 5-Bromo-2’deoxyuridina (BrDU), durante la replicación celular y la posterior tinción con un colorante fluorescente (Hoescht) más Giemsa.

Las ICH se visualizan en los cromosomas que se han replicado dos veces en presencia e BrDU, es decir, se encuentran en la segunda división mitótica (M2). Las células que se encuentran en primera división mitótica (M1) contienen cromosomas unifilarmente sustituidos y se tiñen de oscuro, mientras que las células de la segunda división mitótica (M2) contienen cromosomas ‘arlequines” con una cromátide con una sola cadena de ADN sustituida (se tiñe oscura) y la otra, con ambas cadenas sustituidas (se tiñe clara). De esta forma, los cromosomas de la M2, permiten identificar los intercambios ocurridos ya que los mismos producen una discontinuidad en la coloración de una y otra cromátide.

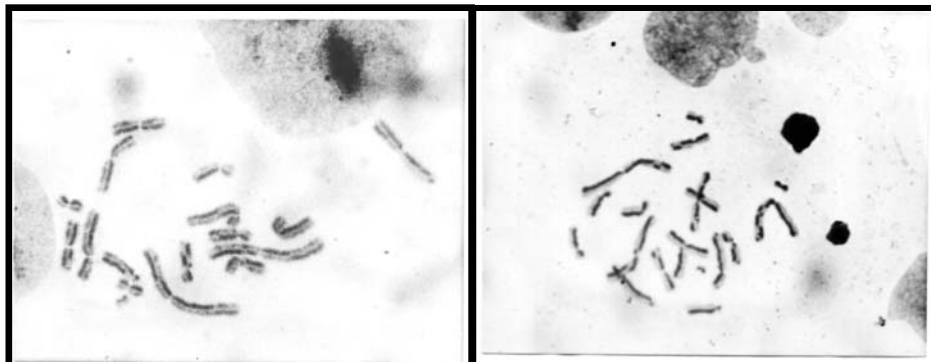


Fig. 7. Células CHO tratadas con Metronidazol.
Análisis de ICH.



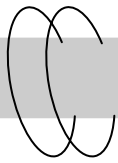
1.5. CITOGENÉTICA DEL MAÍZ

El maíz es una de las pocas especies diploides de cultivos alimenticios y tiene un juego básico de diez cromosomas. Otras especies del género *Zea* también son diploides con $2n=20$. La especie *Zea diploperennis*, como su nombre lo indica es perenne. *Zea perennis*, otra especie perenne, es un tetraploide con $2n=40$. La otra especie emparentada con el maíz, *Tripsacum*, tiene un número básico de cromosomas de $n=18$. *Tripsacum dactyloides* es un diploide con $2n=36$. En las Maydeas orientales, el género *Coix* tiene el número de cromosomas básico mas bajo de $n=5$. Ambos géneros, *Tripsacum* y *Coix*, tienen especies con mas altos niveles de ploidía y un número variable de cromosomas (Tabla 1).

TABLA 1
Número de cromosomas en varias especies de la tribu *Maydeae*

Número de cromosomas (2n)	Nombre de las especies
10	<i>Coix aquatica</i> ; <i>C. poilanei</i>
20	<i>Zea mays</i> ; <i>Z. diploperennis</i> ; <i>Z. luxurians</i> ; <i>Z. mexicana</i> ; <i>Z. parviglumis</i> ; <i>Coix lacryma-jobi</i> ; <i>C. gigantia</i> ; <i>Chionachne koenigii</i> ; <i>Ch. semiteres</i> ; <i>Sclerachne punctata</i> ; <i>Polytoca macrophylla</i> ; <i>Trilobachne cookei</i>
32	<i>Coix</i> spp.
36	<i>Tripsacum australe</i> ; <i>T. bravum</i> ; <i>T. dactyloides</i> ; <i>T. floridanum</i> ; <i>T. latifolium</i> ; <i>T. laxum</i> ; <i>T. pilosum</i> ; <i>T. maizar</i> ; <i>T. manisuroides</i> ; <i>T. zopilotense</i>
40	<i>Zea perennis</i> ; <i>Coix gigantia</i>
54	<i>Tripsacum bravum</i> ; <i>T. dactyloides</i> ; <i>T. intermedium</i> ; <i>T. latifolium</i> ; <i>T. maizar</i> ; <i>T. pilosum</i> ; <i>T. zopilotense</i>
64	<i>Tripsacum andersonii</i>
72	<i>Tripsacum bravum</i> ; <i>T. dactyloides</i> ; <i>T. intermedium</i> ; <i>T. lanceolatum</i> ; <i>T. latifolium</i> ; <i>T. maizar</i> ; <i>T. pilosum</i>
90 o +	<i>T. dactyloides</i> ; <i>T. intermedium</i> ; <i>T. pilosum</i>

Fuente: Berthaud *et al.*, 1995; de Wet y Harlan, 1978; Galinat, 1988; Kato-Y, 1976; Sachan y Sarkar, 1985



1.6. CICLO CELULAR

El ciclo celular es el mecanismo universal de reproducción de las células eucariontes, cuyo evento principal es la reproducción del número de cromosomas, siendo la mitosis el mecanismo de división de los cromosomas, del núcleo y de toda la célula. (Fig. 2)

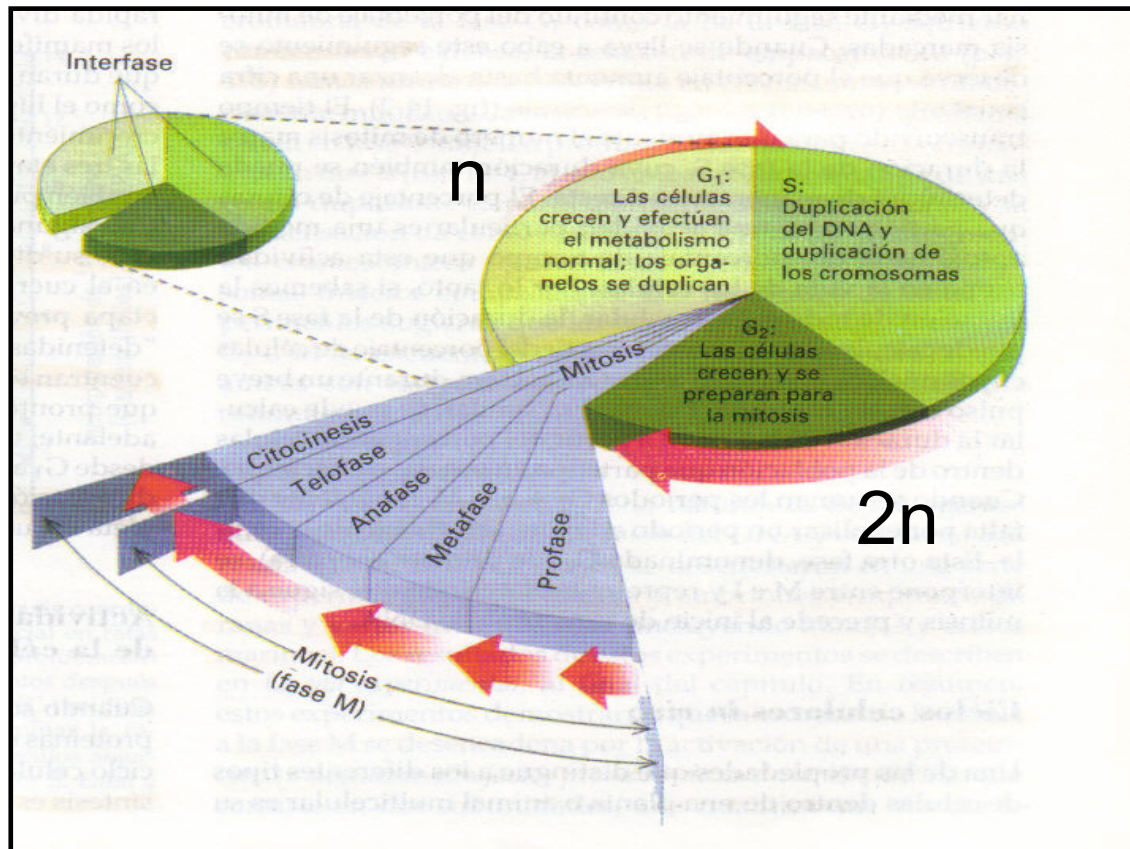
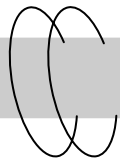


Fig. 8 Ciclo Celular

Durante la interfase es posible observar un período S (síntesis) y dos periodos G, G₁ (anterior a S) y G₂ (posterior a S). Durante el periodo comprendido entre la telofase y la fase S, los núcleos presentan la cantidad de material genético propio de la especie ($2n$). Durante la fase S esta cantidad aumenta paulatinamente y a partir del período G₂ hasta la siguiente telofase es el doble.



1.6.2. FASES DEL CICLO CELULAR

El ciclo celular completo (regular) del organismo en crecimiento comprende dos etapas: la interfase (prolongada) y la mitosis (más breve: de 1/7 a 1/10 de todo el ciclo celular), que consta de cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase. (Ver Fig. 5).

1. El material cromosómico se condensa para formar cromosomas mitóticos compactos.
2. Los cromosomas compuestos de dos cromátides se unen al centrómero.
3. Se ensambla el huso mitótico.
4. El citoesqueleto y la envoltura nuclear desaparecen.

1. Los cromosomas se desplazan hacia el ecuador del huso.

1. Los cromosomas se alinean a lo largo de la placa metafásica, unidos por microtubulos cromosómicos a ambos polos.

1. Desdoblamiento de los centrómeros y separación de las cromátides.
2. Los cromosomas se mueven hacia los polos opuestos del huso.
3. Los polos del huso se separan.

1. Los cromosomas se agrupan en polos opuestos al huso.
2. Los cromosomas se dispersan.
3. Se ensambla la envoltura nuclear alrededor de los grupos de cromosomas.
4. El complejo de Golgi y el RE se reconstituyen.

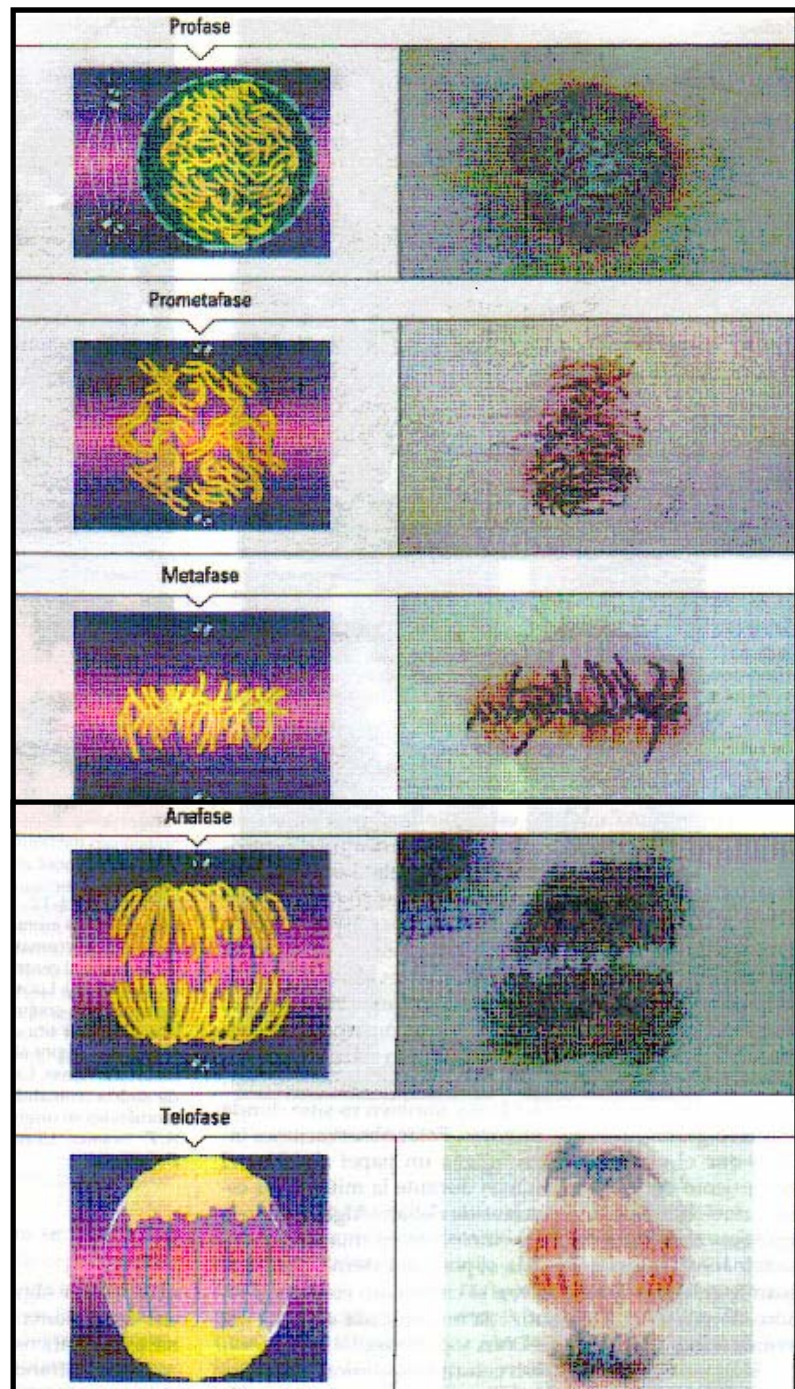
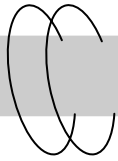


Fig. 9 Fases del ciclo celular.



1.7. ENVEJECIMIENTO NATURAL

1.7.1 ALMACENAMIENTO DE LAS SEMILLAS

El almacenamiento es la etapa posterior a la cosecha de maíz. La semilla aún almacenada, continua realizando los procesos fisiológicos básicos para mantenerse con vida. El deterioro de la semilla ocurre como una consecuencia fisiológica y bioquímica (McDonald, 1988). Los daños acumulados en el tiempo se presentan a nivel fenotípico y genotípico. En México, se pierde 10-25 % de la cosecha por estos factores.

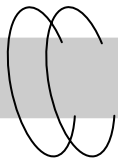
Los factores que se deben de cuidar en el almacenamiento son:

- Humedad.
- Temperatura.
- Factores bióticos (insectos, microorganismos, roedores, etc.)

Estos factores disminuyen la capacidad germinativa de la semilla, por lo tanto si mejoramos las condiciones de almacenamiento ayudara a disminuir en gran medida la pérdida de vigor en la semilla (Fig. 6).



Fig. 10 Almacenamiento de Semillas



1.7.2. EFECTOS NEGATIVOS DEL ALMACENAMIENTO

Estos efectos se ven reflejados en daños estructurales y funcionales a nivel membrana, cuando se presentan altas temperaturas. Los problemas de la membrana se relacionan con la peroxidación de lípidos seguida de un nivel bajo de la actividad metabólica. (Wilson y McDonald, 1986).

La presencia de humedad provoca el aumento de la tasa respiratoria y pérdida de sustratos metabólicos, tales como azúcares, iones inorgánicos y aminoácidos, lo cual se relaciona con la actividad enzimática y la reducción de la síntesis macromolecular (Bewly y Black, 1994). También hay alteraciones en la integridad molecular, cambios de los cromosomas, ácidos nucleicos y la integridad de la DNA polimerasa. (Priestley, 1986). La semilla posee la capacidad genotípica para restaurar, bajo ciertos límites los daños que ocurren a nivel metabólico.

1.8. ENVEJECIMIENTO ARTIFICIAL

1.8.1 TÉCNICA DEL ENVEJECIMIENTO ACELERADO

El envejecimiento acelerado es una técnica utilizada para deteriorar la semilla en forma similar a la que ocurre en el proceso natural. Este envejecimiento acelerado ocasiona deficiencias en el proceso metabólico durante la germinación, tales como pérdida de la funcionalidad de la membrana, disminuye la germinación, la velocidad de crecimiento de la planta y la tolerancia a condiciones adversas (Anderson, 1973).

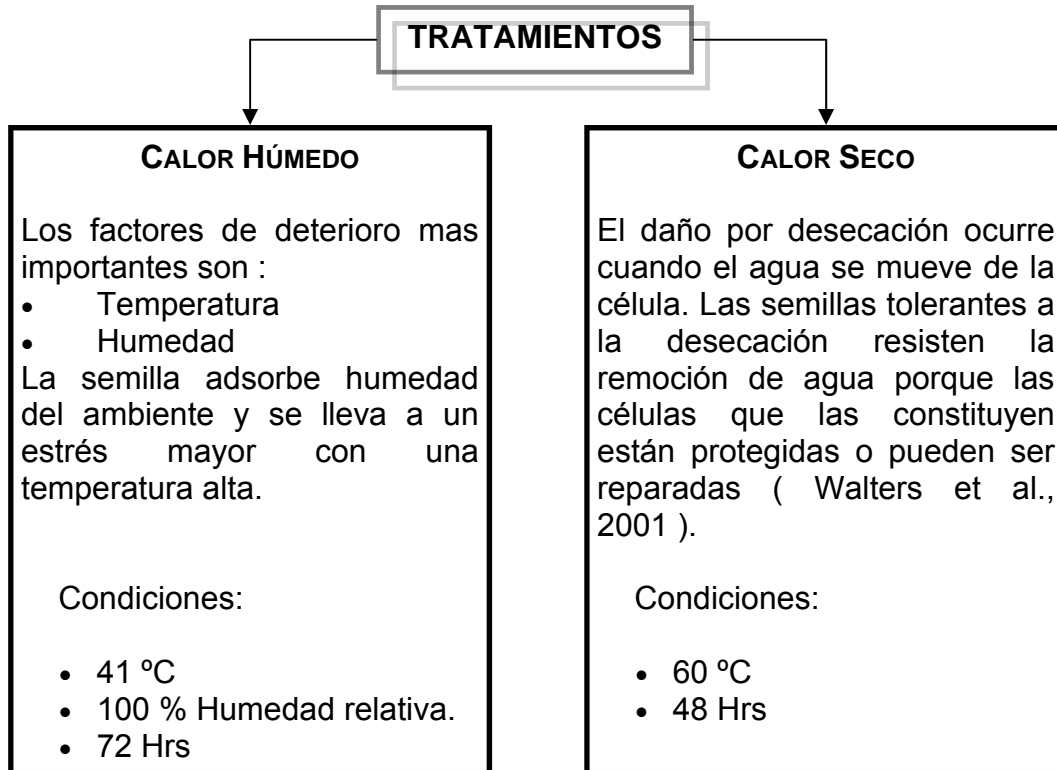
Las alteraciones que provocan tales condiciones, a las que se someten las semillas, provocan una generación de plántulas anormales, un decremento en su longitud y vulnerabilidad a patógenos, pérdida de compuestos solubles debido a una excesiva permeabilidad de la membrana, reducción de la actividad enzimática y producción de sustancias tóxicas como ácidos grasos libres (Anderson, 1973).

Los tratamientos de envejecimiento acelerado nos permiten simular los daños metabólicos acumulados en las semillas durante su almacenamiento y aquellos ocasionados por la edad.

Todo esto con la finalidad de entender cuáles son los procesos fisiológicos y metabólicos que actúan en la formación de la plántula. Es importante tomar en cuenta estos factores, si lo que pretendemos es tener una semilla que posea una alta capacidad germinativa al momento de ser sembrada y una cosecha de alta calidad y productividad.

1.8.2. ENVEJECIMIENTO ACELERADO TRATAMIENTOS

Existen dos tratamientos en el envejecimiento acelerado: Calor Húmedo (CH) y Calor Seco (CS).



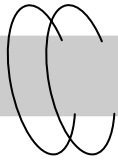
COMPARACIÓN



Fig. 11 Calor Húmedo y Testigos



Fig. 12 Calor Seco y Testigos



2. JUSTIFICACION

Cuando las semillas están expuestas a un almacenamiento inadecuado o cuando la edad de la semilla es avanzada; el daño mas frecuente en la semilla es la perdida de vigor. Es importante tomar en cuenta estos factores, si lo que pretendemos es tener una semilla que posea una alta capacidad germinativa al momento de ser sembrada y una cosecha de alta calidad y productividad.

Proponemos un método de envejecimiento acelerado el cual simulará los daños que a nivel citogenético la semilla sufre al paso del tiempo de manera natural. Estos daños en el DNA los evidenciaremos con técnicas citogenéticas que compararemos con semillas testigo.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo es hacer una recopilación de información y el planteamiento teórico-experimental de las técnicas citogenéticas de Índice de Cromátidas Hermanas (ICH) y ensayo cometa para células vegetales. Para tal efecto se observarán las alteraciones citogenéticas suscitadas a nivel radicular durante el periodo de germinación de semillas de maíz sometidas a tratamientos de envejecimiento acelerado.

3.1.2. Metas.

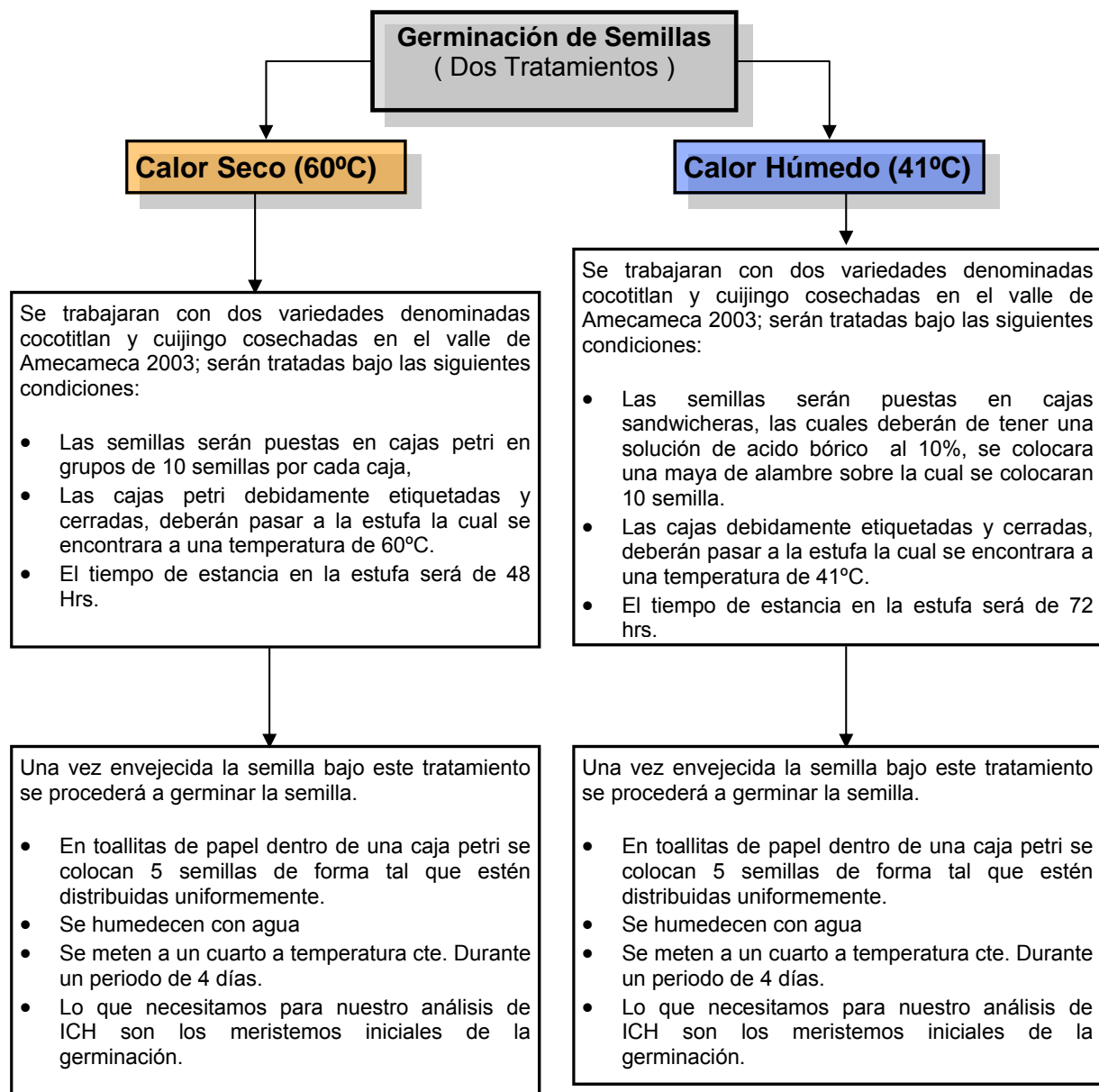
- Cuantificar la duración relativa de las etapas mitóticas mediante análisis de la frecuencia de células en activa proliferación: Índice de Fase(% IF) e Índice Mitótico(% IM).
- Analizar el ciclo celular, en el tejido radicular (de activa proliferación).
- Obtención de preparaciones microscópicas semi permanentes.
- Caracterización del ciclo celular.
- Observación y análisis detallado de las fases mitóticas: profase, metafase, anafase y telofase.

4. METODOLOGÍA

4.1. DIAGRAMA EXPERIMENTAL

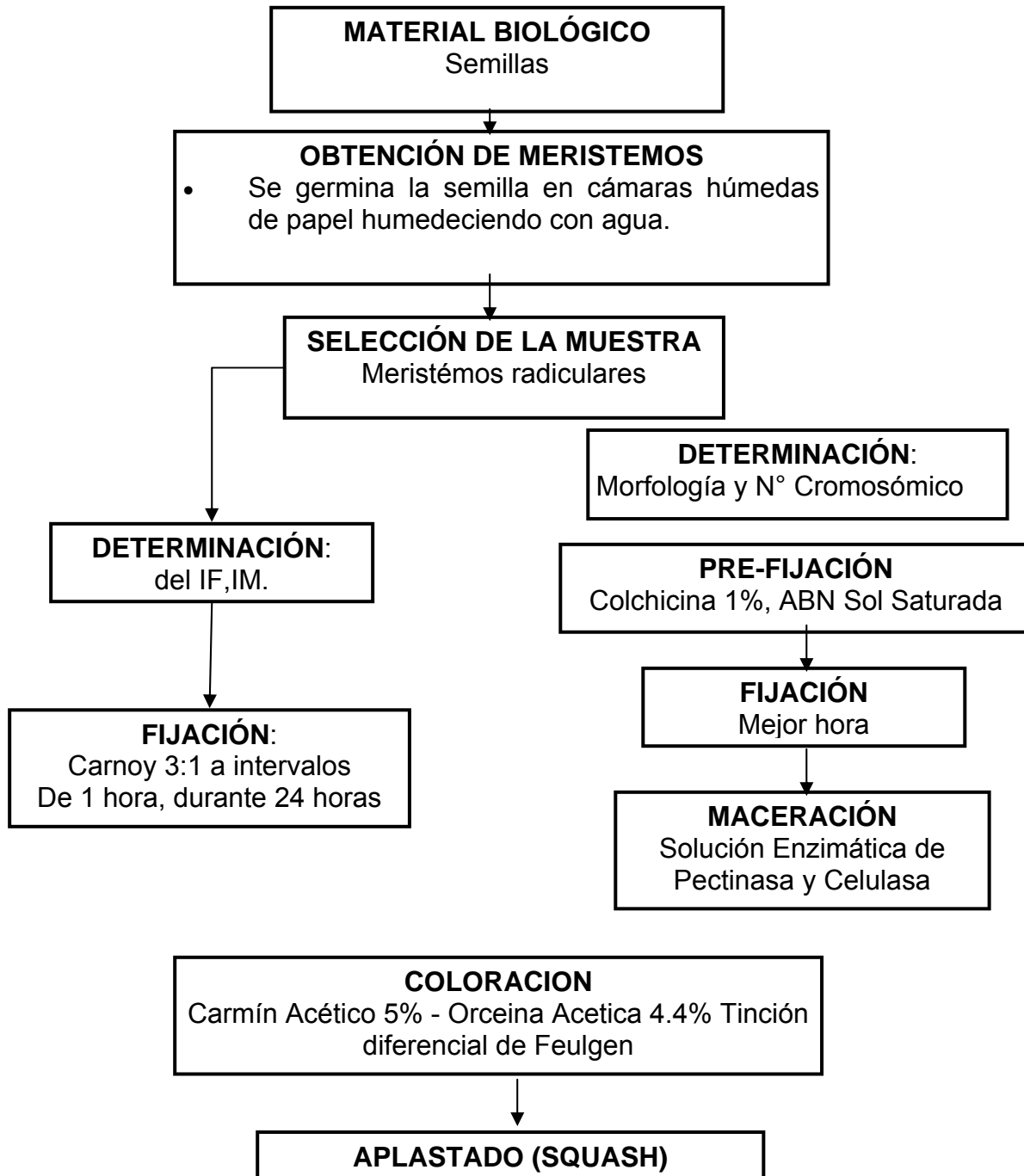
4.1.1. ENVEJECIMIENTO ARTIFICIAL

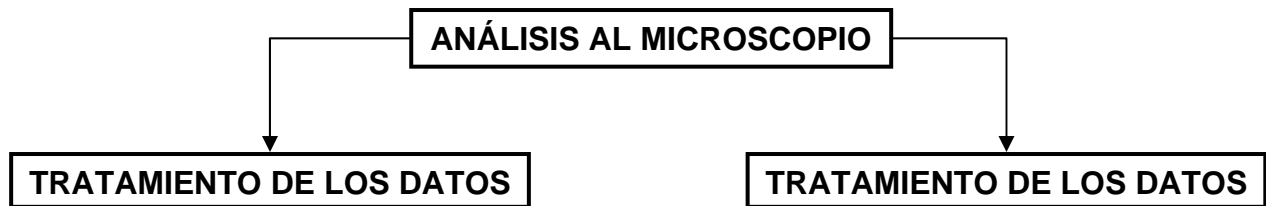
El envejecimiento acelerado es una técnica utilizada para deteriorar la semilla en forma similar a la que ocurre en el proceso natural. Este envejecimiento acelerado ocasiona deficiencias en el proceso metabólico durante la germinación, tales como pérdida de la funcionalidad de la membrana, disminuye la germinación, la velocidad de crecimiento de la planta y la tolerancia a condiciones adversas (Anderson, 1973).



4.1.2. ÍNDICE DE CROMÁTIDES HERMANAS (ICH)

Los intercambios de cromátides hermanas constituyen la representación visible al microscopio óptico de un fenómeno cromosómico cuya implicación molecular incluye el intercambio de una forma simétrica y recíproca de fragmentos de ADN entre cromátides hermanas de cromosomas eucariotas, en especies animales y vegetales.





TRATAMIENTO DE LOS DATOS

TRATAMIENTO DE LOS DATOS

IF= Índice de Fase
IM= Índice Mitótico

Numero cromosómico

IF e IM, **PARCIALES** (%) cada hora.

MORFOLOGIA CROMOSOMICA

$$IF = \frac{\text{Nº de Células c/fase}}{\text{Nº Total de Células}} \times 100$$

$$IM = IF_p + IF_m + IF_a + IF_t$$

bc = Brazo Corto
Bl = Brazo Largo
La = bc + bl
LI = (La, / <La n) x 100
lc = (bc / La) x 100

IF e IM. **TOTALES** (%)

$$IF = \frac{\text{IF \% Parcial c/fase}}{\text{Nº de horas}}$$

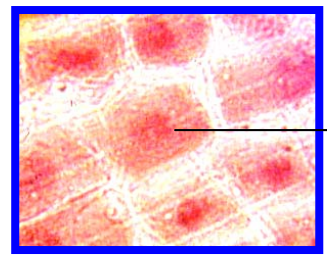
$$IM = IF_p + IF_a + IF_t \text{ (IF Totales)}$$

OBTENCIÓN DE MICROFOTOGRAFIAS

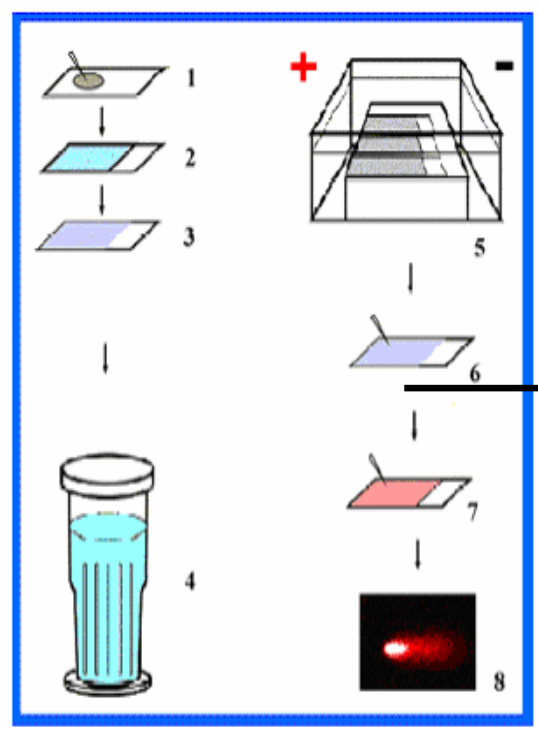
INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1.3 ENSAYO COMETA

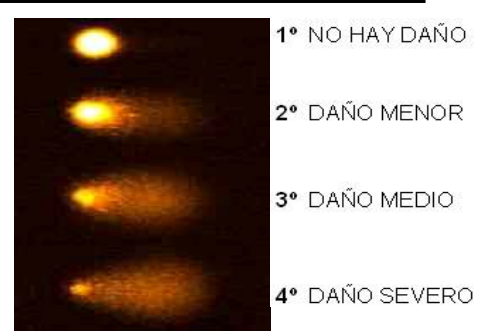
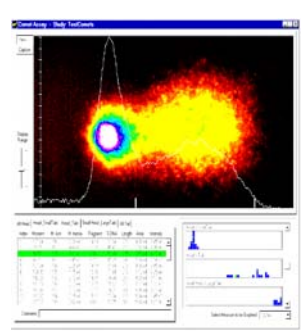
Es una electroforesis de células individuales es una prueba rápida, de bajo costo y con una sensibilidad que supera en más de 100 veces a las pruebas citogenéticas y que permite detectar roturas de cadena simple. Este ensayo puede ser aplicado a cualquier célula eucariota y permite el análisis del daño genético al nivel de células individuales.



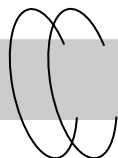
EXTRACCIÓN DE NÚCLEOS
> 10,000



PROTOCOLO DE ENSAYO
COMETA



ANÁLISIS DE IMÁGENES



4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. ENVEJECIMIENTO ARTIFICIAL

MATERIAL BIOLÓGICO

En todos los experimentos aquí descritos se utilizaron semillas de maíz de las variedades cuijingo y cocotitlan de la raza chalqueño, las cuales fueron cosechadas en el valle de Amecameca en el 2003.



- Las semillas fueron puestas en cajas petri en grupos de 10 semillas por cada caja,
- Las cajas petri debidamente etiquetadas y cerradas, deberán pasar a la estufa la cual se encontrara a una temperatura de 60°C.
- El tiempo de estancia en la estufa será de 48 Hrs

- Las semillas fueron puestas en cajas sandwicheras, las cuales deberán de tener una solución de acido bórico al 10%, se colocara una maya de alambre sobre la cual se colocaran 10 semilla.
- Las cajas debidamente etiquetadas y cerradas, deberán pasar a la estufa la cual se encontrara a una temperatura de 41°C.
- El tiempo de estancia en la estufa será de 72 hrs

**4.2.2. ÍNDICE DE CROMÁTIDES HERMANAS (ICH)****MATERIAL BIOLÓGICO**

En todos los experimentos aquí descritos se utilizaron semillas c/s tratamiento de las variedades cuijingo y cocotitlan de la raza chalqueño, las cuales fueron cosechadas en el valle de Amecameca en 2003.

MATERIAL	REACTIVOS	EQUIPO
1 caja de portaobjetos	Orceina Acetica	Microscopio óptico
1 caja de cubreobjetos	Carmín propiónico	Horno 60°C
32 cajas petri	Colchicina 1%	
3 vasos de precipitado 50 ml	8-hidroxiquinoleína	
1 paquete de servitoallas	Ácido propiónico 45%	
4 vidrio de reloj	Ácido acético 45%	
5 pipetas pasteur	Carnoy	
papel filtro	Pectinasa al 2% en	
papel cera	amortiguador de citratos	
3 bisturí		
1 tijeras finas		
1 marcador indeleble		

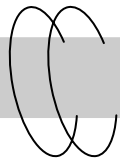
Se utilizaron 20 de las 100 semillas de cada tratamiento para esta prueba, tomando 40 semillas sin tratamiento como testigos; en la primera etapa se realizó un estudio detallado del ciclo celular, esto para ubicar el preciso momento en el cual los cromosomas presentan su mayor grado de condensación.

En la segunda etapa de este experimento ya con los análisis de IF e IM totales y parciales se continuó el tratamiento de ICH.

Calor Seco (60°C)	Testigos	Calor Húmedo (41°C)	Testigos
20 semillas V-cuijingo	20	20 semillas V-cuijingo	20
20 semillas V-cocotitlan	20	20 semillas V-cocotitlan	20

Todas las semillas con tratamiento y sus respectivos testigos fueron sometidas a la germinación de la siguiente manera:

- En toallitas de papel dentro de una caja petri se colocaron 5 semillas de forma tal que estén distribuidas uniformemente.
- Se humedecen con agua
- Se colocaron en un cuarto a temperatura cte. Durante un periodo de 3-4 días.
- Lo que necesitamos para nuestro análisis de ICH son los meristemos iniciales de la germinación.



PRE-TRATAMIENTO PARA ESTUDIO DE CROMOSOMAS SOMÁTICOS

Usando **ACETO-ORCEINA**
como colorante

1. Se realizó la fijación en CARNOY de 2-24 hrs a temperatura ambiente o bien por 15 min a 60 °C.
2. Pasado este tiempo se colocaron en colchicina al 1 % durante 3 h, posteriormente se aplicó ácido acético al 100 % por una hora para posteriormente aplicar fijador (etanol-ácido acético 3:1) y se guardaron en el congelador por 2 días.
3. La fijación y tinción de las células se realizó bajo el protocolo que se describe a continuación.

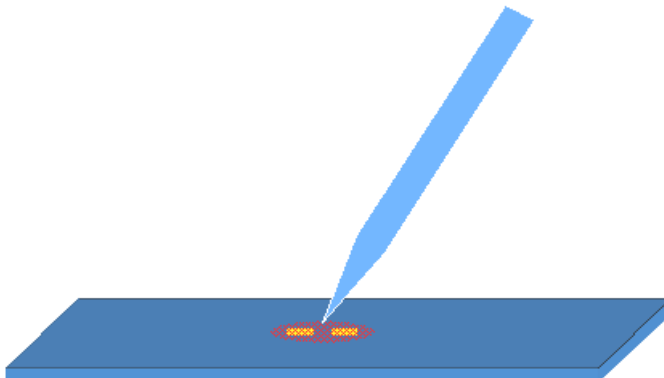
Usando **CARMIN-PROPIÓNICO**
como colorante

1. Se pre-trataron los ápices por 8-10 hrs en solución acuosa 0.002M de 8-hidroxiquinoleína a 14-15 °C.
2. se fijaron los ápices radicales en CARNOY por 24-48 hrs.
3. Se colocaron los ápices radicales por 1-2 hrs en tubos de ensayo de fondo plano de 12-15 ml de capacidad con la solución de colorante que en este caso es carmín propiónico 1%. Luego se calienta el tubo casi a ebullición por 4-6 veces.
4. Los ápices fueron puestos en jugo gástrico de caracol o citasa. La citasa puede recogerse para ser usada de nuevo.
5. La preparación se realiza de forma usual, esto es siguiendo el protocolo de aplastamiento o "squash".

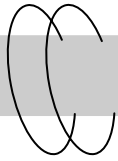
FIJACIÓN Y TINCIÓN DE LAS CÉLULAS

- Se cortaron las raicillas, tomando solamente la parte apical de 1-2 cm, que se arrancan con ayuda de unas pinzas o cortándolas con unas tijeras finas.
- Se pasaron estos fragmentos con ayuda de unas pinzas a un vidrio de reloj y se añaden gotas de la solución de fijación hasta cubrirlos, evitando que se sequen. Se fijan durante 10 minutos.

Como fijador se utilizó **Carnoy**, que consiste en una mezcla de etanol y ácido acético en proporción 3:1.



Este fijador mata las células instantáneamente y estabiliza todas las estructuras celulares, impidiendo la degradación por enzimas y la destrucción o movimiento de estructuras, con lo cual obtendremos una imagen fija de las células tal y como se encontraban en ese momento.



MATERIALES Y MÉTODOS

- Se eliminó el fijador aspirándolo con una pipeta Pasteur, o absorbiéndolo con ayuda de un papel filtro. Se añade inmediatamente el colorante que se va a utilizar para teñir las células.
- Para la tinción se utilizó Orceína acético-clorhídrica. Se añade gota a gota con ayuda de una pipeta Pasteur hasta cubrir las abundantemente.
- Tomando el vidrio de reloj por los bordes con ayuda de las pinzas, se calienta suavemente a la llama de un mechero de alcohol de laboratorio. Puede utilizarse en su defecto un mechero de mano o una vela, nunca un mechero de gas de laboratorio.

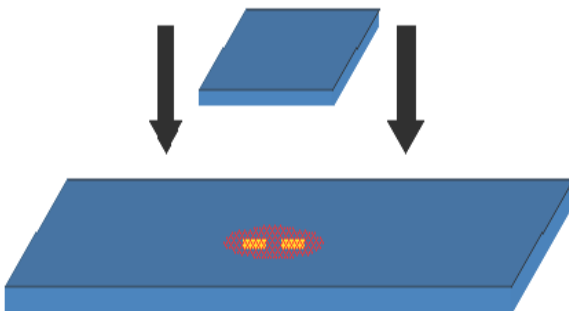
Se flamea suavemente hasta la emisión de vapores, moviéndolo en círculos y evitando la ebullición, para lo cual no debe mantenerse sobre la llama más de 5 segundos.

Se deja enfriar y se repite dos o tres veces, durante los 10-15 minutos que dura la tinción.

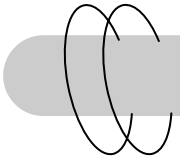
- Se colocó una raíz sobre un porta y se corta, con ayuda de un bisturí o una cuchilla, el fragmento terminal de aproximadamente 3mm, tomando únicamente el extremo apical y el resto se desecha.
- Se añadió alrededor una gota de ácido acético 45%, o bien una gota del mismo colorante que se utilizó para teñir. Se coloca encima un cubre, dejándolo caer suavemente desde un extremo y cuidando que no queden burbujas de aire.
- A continuación se realizó el aplastamiento o “squash” del tejido, que ha sido reblandecido por el tratamiento con acético y clorhídrico en caliente, para liberar y separar las células.

Con la punta de una lanceta o en su defecto con la punta de la goma de un lápiz, se golpea repetidamente sobre el cubre, justamente en la zona donde se encuentra el material y disgregándose el tejido de la raíz, hasta formar una monocapa de células.

- Sobre la preparación se colocó papel filtro, doblado varias veces para evitar mancharse y con el pulgar se presiona sobre el papel filtro en la región del cubre. Al principio debe presionarse suavemente pero luego con intensidad, sin embargo debe evitarse que con la presión el cubre resbale sobre el porta, ya que este deslizamiento rompería todas las células.



- Sellar todos los bordes del cubre con laca de uñas transparente, para evitar que se seque. De esta forma la preparación puede mantenerse durante varios días. Una vez bien seca la laca, nunca antes ya que podrían dañarse los objetivos al rozar con la laca, puede pasar a observarse al microscopio.



ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR

Se observaron en campos al azar 500 células contabilizándose las células en división (Profase, metafase, anafase y telofase) para determinar el índice mitótico e índice de frecuencia total y parcial que se obtuvieron de la siguiente manera:

IF= Índice de Fase
IM= Índice Mitótico

ESTADO	TOTAL	I	P	M	A	T
Frecuencia						
IF (%)						
IM (%)						

IF e IM, **PARCIALES** (%) cada hora.

IF e IM. **TOTALES** (%)

$$IF = \frac{\text{Nº de Células c/fase}}{\text{Nº Total de Células}} \times 100$$

$$IF = \frac{\text{IF \% Parcial c/fase}}{\text{Nº de horas}}$$

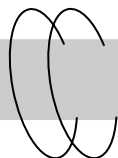
$$IM = IF_p + IF_m + IF_a + IF_t$$

$$IM = IF_p + IF_a + IF_t \text{ (IF Totales)}$$

ANÁLISIS ICH

Para realizar el análisis de los ICH se observaron 25 células en metafase para cada experimento y su réplica.

Se contaron los intercambios terminales y los intersticiales registrándose como uno y dos eventos respectivamente.

**4.2.3. ENSAYO COMETA****MATERIAL BIOLÓGICO**

En todos los experimentos aquí descritos se utilizaron semillas c/s tratamiento de las variedades cuijingo y cocotitlan de la raza chalqueño, las cuales fueron cosechadas en el valle de amecameca en 2003.

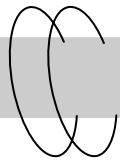
Para todos los experimentos se utilizaron ejes embrionarios de semillas c/s tratamiento, los cuales se extrajeron manualmente.

MATERIAL	REACTIVOS	EQUIPO
1 caja de portaobjetos	Solución amortiguadora 1	Microscopio de fluorescencia
1 caja de cubreobjetos	Solución amortiguadora 2	Cubeta de electroforesis horizontal
3 morteros con pistilo	Agarosa de bajo punto de fusión (LPMA)	Horno 30°C
3 vasos de precipitado 50 ml	Agarosa de punto de fusión normal (NPMA).	Dispositivo de filtración al vacío
1 paquete de servitoallas	Solución de lisis	
5 pipetas pasteur	Cloroformo 30%	
papel filtro	Buffer de corrida	
papel cera	Bromuro de etidio	
3 bisturí	Azul de Tripano	
1 tijeras finas		
1 marcador indeleble		

Se utilizaron 80 de las 100 semillas de cada tratamiento para esta prueba, tomando 80 semillas sin tratamiento como testigos.

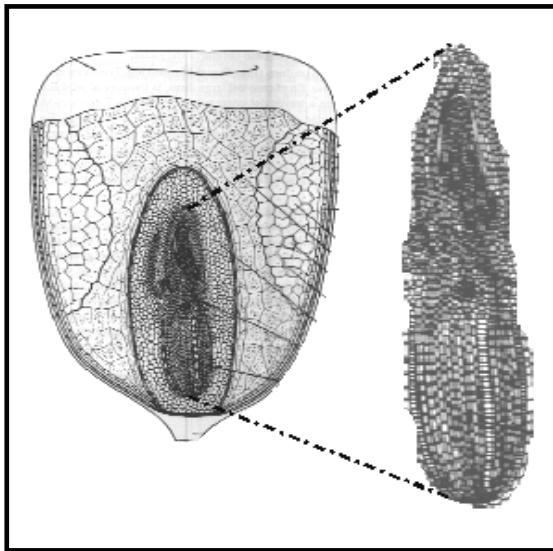
Calor Seco (60°C)	Testigos	Calor Húmedo (41°C)	Testigos
80 semillas V-cuijingo	80	80 semillas V-cuijingo	80
80 semillas V-cocotitlan	80	80 semillas V-cocotitlan	80

La primera etapa de este experimento consistió en la extracción de los núcleos de las células, para tal caso se extrajeron los embriones de las semillas. En la metodología del ensayo cometa se necesitan al menos 10,000 núcleos aislados y viables, por tal motivo se necesita una gran cantidad de embriones.



METODOLOGÍA EXTRACCIÓN DE NÚCLEOS (Método modificado de D'Allessandro y Dunham, 1980).

Para todos los experimentos se utilizaron ejes embrionarios de semillas c/s tratamiento, los cuales se extrajeron manualmente.



Las muestras de ejes embrionarios se colocaron sobre un mortero preenfriado y se homogenizaron con 1.5 volúmenes de solución amortiguadora N.1 hasta obtener un homogenado de consistencia pastosa.

El homogenado se filtró a través de tres capas de papel miracloth, con ayuda de vacío, la suspensión obtenida se centrifuga durante 40 min. a 20,000 xg.

Los núcleos sedimentados se resuspenden con 3 ml de solución amortiguadora de fosfatos

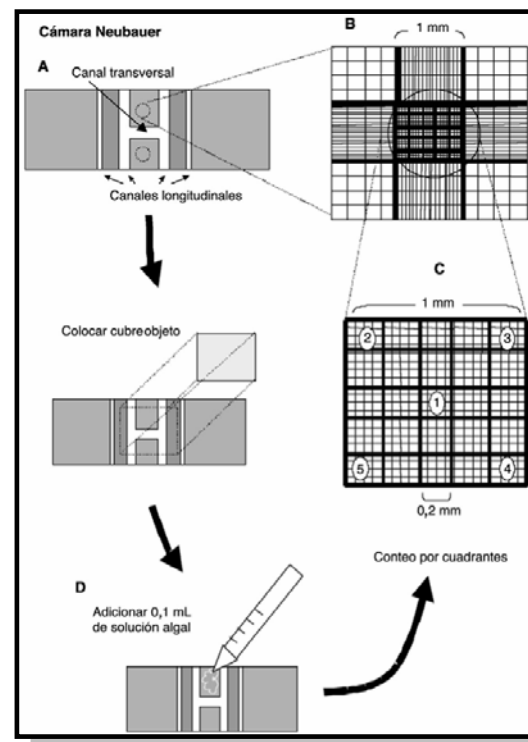
ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

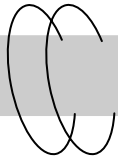
1. Se lavo el hematocitómetro y cubre objetos con alcohol y se enjuago con agua destilada.
2. En tubos de micro ensaye se colocó 0.8 ml de amortiguador, 0.1 ml de la suspensión celular y 0.1 ml de colorante de azul tripano y se mezcló suavemente
3. Se colocó una gota de esta mezcla en el hematocitómetro
4. Se observó la preparación al microscopio y hacer el recuento.

La concentración de células se calculo de la siguiente manera :

$$[] \text{ células / ml} = X * 10^4 * Y$$

X = Número total de células en 25 cuadrantes
 10^4 = transformación del volumen a 1 cm^3
Y = Factor de dilución



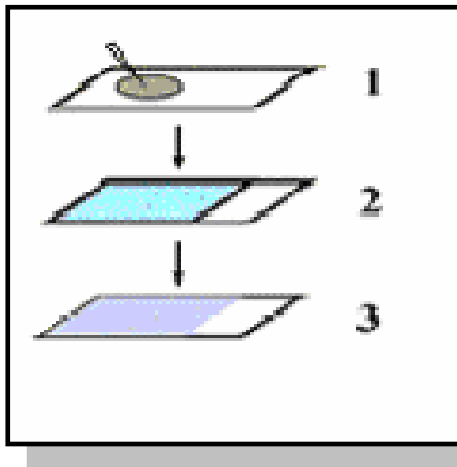


PREPARACIÓN DE LAS LAMINILLAS

En la segunda etapa del experimento se realizó la preparación de las laminillas que se utilizaron para el ensayo cometa.

Existen dos maneras de preparar las laminillas: la primera consiste en utilizar portaobjetos esmerilados los cuales no necesitan un tratamiento previo pero son muy costosos, la segunda es utilizar portaobjetos tradicionales (sin esmeril) los cuales necesitan un tratamiento previo para ser utilizados.

En nuestro caso utilizamos portaobjetos pulidos de 24.4 x 76.2 mm 1' x 3'; espesor 1 – 1.2 mm de la marca CRISA.



Se prepararon laminillas de la siguiente manera:

1. Las laminillas se cubren con Agarosa de punto de fusión normal (NPMA).
2. Se dejó solidificar por 5 min.
3. Las laminillas se metieron a una estufa a 30 °C durante toda la noche esto para deshidratar las laminillas y permitir que la agarosa se impregne perfectamente en el portaobjeto.

PROTOCOLO ENSAYO COMETA

Se preparo la muestra de la siguiente manera:

Total de Muestra 75 μ l

De los cuales:

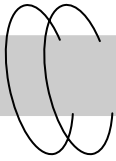
25 μ l de Muestra

50 μ l de Agarosa de bajo punto de fusión

50 μ l de Muestra

25 μ l de Agarosa de bajo punto de fusión

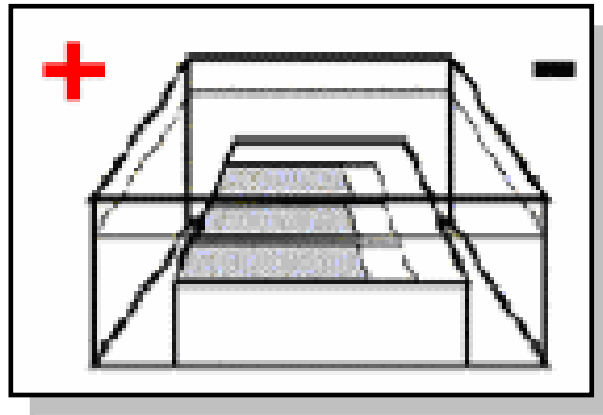
La muestra (75 μ l) se colocó en las laminillas que previamente fueron preparadas con agarosa de punto de fusión normal (NPMA). Se colocó un cubreobjetos sobre la preparación.



Se colocaron las laminillas en la cubeta de electroforesis horizontal (12 laminillas por corrida).

Se incubaron las láminas en solución de lisis 2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM Tris. HCl, pH 12,1 % Triton X-00 a 4 °C por 1 hora en una cubeta de electroforesis horizontal.

La corrida se efectuó en el buffer 0,3 M NaOH 1mM EDTA a 0,7 V/cm durante 30 minutos a 4 °C.



Todo el proceso se realizó con luz amortiguada.

Las preparaciones se tiñeron con bromuro de etidio.

Se analiza la imagen del cometa en un microscopio de fluorescencia.



5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. ENVEJECIMIENTO ARTIFICIAL

Se realizó un análisis estadístico aplicando la prueba de Tukey para comparar los tratamientos y las diferencias que existen entre estos y las dos variedades de maíz.

Los parámetros a comparar son:



PN: Plántula Normal



PA: Plántula Anormal



SM: Semilla Muerta

Los resultados fueron presentados en % de semillas de cada lote.

V
A
R
I
E
D
A
D

1

TESTIGOS Resultados en %

- Total Plantulas Normales: 90 %
- Total Plantulas Anormales: 1,1 %
- Total Semillas Muertas: 8,8%

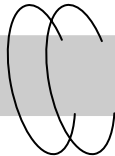
Calor Seco Resultados en %

- Total Plantulas Normales: 82,5 %
- Total Plantulas Anormales: 10 %
- Total Semillas Muertas: 7,5%

Calor Húmedo Resultados en %

- Total Plantulas Normales: 85 %
- Total Plantulas Anormales: 2,5%
- Total Semillas Muertas: 12,5%

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS



TESTIGOS Resultados en %	
● Total Plantulas Normales:	92%
● Total Plantulas Anormales:	1%
● Total Semillas Muertas:	6%

Calor Seco Resultados en %	
● Total Plantulas Normales:	47,5%
● Total Plantulas Anormales:	20%
● Total Semillas Muertas:	32,5%

Calor Húmedo Resultados en %	
● Total Plantulas Normales:	78%
● Total Plantulas Anormales:	5%
● Total Semillas Muertas:	17%

V
A
R
I
E
D
A
D

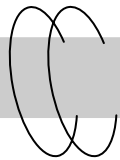
2

Estos resultados en % fueron transformados a una distribución normal mediante la relación $y = (\arcsen(x))^{1/2}$ siendo x los valores porcentuales de las variables (Tabla 3).

VAR 1						
	TESTIGOS %	Análisis estadístico (arcsen(x)) ^{1/2}	CALOR SECO 60°C %	Análisis estadístico (arcsen(x)) ^{1/2}	CALOR HÚMEDO 41 °C %	Análisis estadístico (arcsen(x)) ^{1/2}
PN	90	8	82,5	7,456	85	7,63
PA	1,1	0,793	10	2,396	2,5	1,197
SM	8,8	2,247	7,5	2,074	12,5	2,68

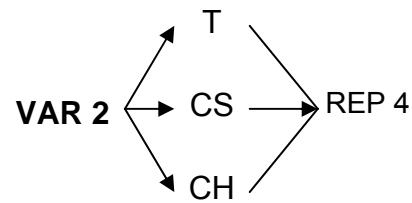
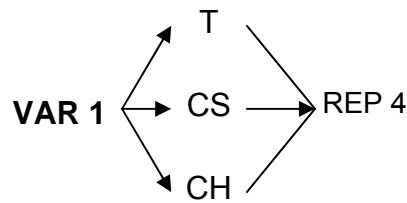
VAR 2						
	TESTIGOS %	Análisis estadístico (arcsen(x)) ^{1/2}	CALOR SECO 60°C %	Análisis estadístico (arcsen(x)) ^{1/2}	CALOR HÚMEDO 41 °C %	Análisis estadístico (arcsen(x)) ^{1/2}
PN	92	8,181	47,5	5,325	78	7,16
PA	1	0,757	20	3,397	5	1,693
SM	6	1,855	32,5	4,355	17	3,129

Tabla 3. Tratamiento de datos para el análisis estadístico de las dos variedades de maíz.



ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para la prueba de tukey se tomaron 6 tratamientos: (T, CS, CH) de las dos variedades, 4 repeticiones, CME= 0.25, Nivel de significancia de 0.05, GL de 6 y una Tukey de 1.4075 los resultados de la prueba se muestran a continuación.



PRUEBA DE TUKEY PARA PLÁNTULAS NORMALES (PN)

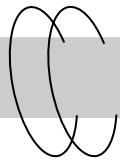
Tabla 2. Resultados de la prueba de Tukey para PN

		TRATAMIENTO		MEDIA
V 1	T	A	1	8
	CS	B	2	7,456
	CH	C	3	7,63
V 2	T	D	4	8,181
	CS	E	5	5,325
	CH	F	6	7,16

TRATAMIENTO		MEDIA	
D	4	8,181	a
A	1	8	a
C	3	7,63	a
B	2	7,456	a
F	6	7,16	a
E	5	5,325	b

Comp.	Dif.	1°_Prom.	2°_Prom.	DMS	
D-E	2.8560	8.1810	5.3250	0.3519	*
D-F	1.0210	8.1810	7.1600	0.3519	*
D-B	0.7250	8.1810	7.4560	0.3519	*
D-C	0.5510	8.1810	7.6300	0.3519	*
D-A	0.1810	8.1810	8.0000	0.3519	NS
A-E	2.6750	8.0000	5.3250	0.3519	*
A-F	0.8400	8.0000	7.1600	0.3519	*
A-B	0.5440	8.0000	7.4560	0.3519	*
A-C	0.3700	8.0000	7.6300	0.3519	*
C-E	2.3050	7.6300	5.3250	0.3519	*
C-F	0.4700	7.6300	7.1600	0.3519	*
C-B	0.1740	7.6300	7.4560	0.3519	NS
B-E	2.1310	7.4560	5.3250	0.3519	*
B-F	0.2960	7.4560	7.1600	0.3519	NS
F-E	1.8350	7.1600	5.3250	0.3519	*

* Significativo al 0.05 de Probabilidad



ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados arrojados nos dan cuenta de que para las comparaciones (D-A), (C-B), (B-F) no hay una diferencia significativa es decir:

Los dos T de las dos variedades no tienen diferencia, los tratamientos de CS y CH de la V1 no tienen diferencia significativa esto quiere decir que en los dos tratamientos para V1 el número de PN es el mismo.

En el caso de CS de V1 y CH de V2 tampoco hay una diferencia significativa, para los demás casos la diferencia es significativa lo cual nos quiere decir que los tratamientos tienen una influencia directa sobre cada variedad.

Resumiendo los tratamientos CS, CH y T tienen diferencias significativas para la V2 y es el caso contrario para V1 donde sus tratamientos CS y CH no tienen diferencias significativas es decir existe el mismo nivel de daño para la V1.

PRUEBA DE TUKEY PARA PLÁNTULAS ANORMALES (PA)

Tabla 3. Resultados de la prueba de Tukey para PA

		TRATAMIENTO		MEDIA
V 1	T	A	1	0,793
	CS	B	2	2,396
	CH	C	3	1,197
V 2	T	D	4	0,757
	CS	E	5	3,397
	CH	F	6	1,693

		TRATAMIENTO		MEDIA	
E	5			3,397	a
B	2			2,396	ab
F	6			1,693	bc
C	3			1,197	bc
A	1			0,793	c
D	4			0,757	c

Comp.	Dif.	1°_Prom.	2°_Prom.	DMS	
E-D	2.6400	3.3970	0.7570	0.3519	*
E-A	2.6040	3.3970	0.7930	0.3519	*
E-C	2.2000	3.3970	1.1970	0.3519	*
E-F	1.7040	3.3970	1.6930	0.3519	*
E-B	1.0010	3.3970	2.3960	0.3519	*
B-D	1.6390	2.3960	0.7570	0.3519	*
B-A	1.6030	2.3960	0.7930	0.3519	*
B-C	1.1990	2.3960	1.1970	0.3519	*
B-F	0.7030	2.3960	1.6930	0.3519	*
F-D	0.9360	1.6930	0.7570	0.3519	*
F-A	0.9000	1.6930	0.7930	0.3519	*
F-C	0.4960	1.6930	1.1970	0.3519	*
C-D	0.4400	1.1970	0.7570	0.3519	*
C-A	0.4040	1.1970	0.7930	0.3519	*
A-D	0.0360	0.7930	0.7570	0.3519	NS

* Significativo al 0.05 de Probabilidad



ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Analizando los resultados para PA, las diferencias son significativas esto nos dice que las dos variedades de maíz se ven afectadas por los tratamientos de una forma significativa, los tratamientos para la V1 son estadísticamente diferentes, lo mismo es para V2, siendo los T para ambas variedades con igual número de PA es decir una diferencia no significativa.

PRUEBA DE TUKEY PARA SEMILLAS MUERTAS (SM)

Tabla 4. Resultados de la prueba de Tukey para SM

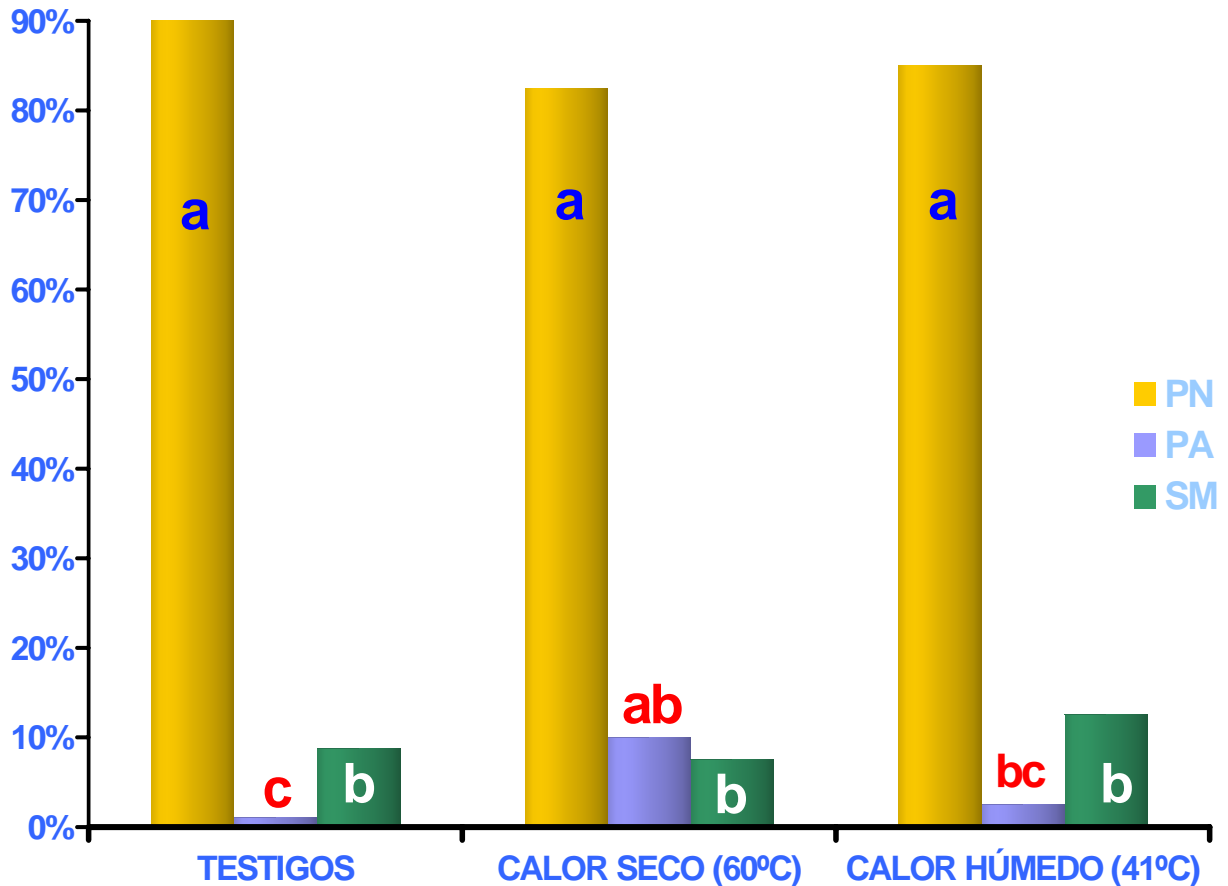
		TRATAMIENTO		MEDIA			TRATAMIENTO		MEDIA	
V 1	T	A	1	2,247	E	5		4,355		a
	CS	B	2	2,074	F	6		3,129		ab
	CH	C	3	2,68	C	3		2,68		b
V 2	T	D	4	1,855	A	1		2,247		b
	CS	E	5	4,355	B	2		2,074		b
	CH	F	6	3,129	D	4		1,855		b

Comp.	Dif.	1°_Prom.	2°_Prom.	DMS	
E-D	2.5000	4.3550	1.8550	0.3519	*
E-B	2.2810	4.3550	2.0740	0.3519	*
E-A	2.1080	4.3550	2.2470	0.3519	*
E-C	1.6750	4.3550	2.6800	0.3519	*
E-F	1.2260	4.3550	3.1290	0.3519	*
F-D	1.2740	3.1290	1.8550	0.3519	*
F-B	1.0550	3.1290	2.0740	0.3519	*
F-A	0.8820	3.1290	2.2470	0.3519	*
F-C	0.4490	3.1290	2.6800	0.3519	*
C-D	0.8250	2.6800	1.8550	0.3519	*
C-B	0.6060	2.6800	2.0740	0.3519	*
C-A	0.4330	2.6800	2.2470	0.3519	*
A-D	0.3920	2.2470	1.8550	0.3519	*
A-B	0.1730	2.2470	2.0740	0.3519	NS
B-D	0.2190	2.0740	1.8550	0.3519	NS

* Significativo al 0.05 de Probabilidad

Para la V1, las SM fueron iguales en CS y T, el CS de la V1 tiene el mismo número de semillas muertas que T de V2.

COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS PARA PN, PA Y SM DE LA VARIEDAD 1 (SAN JOSÉ)



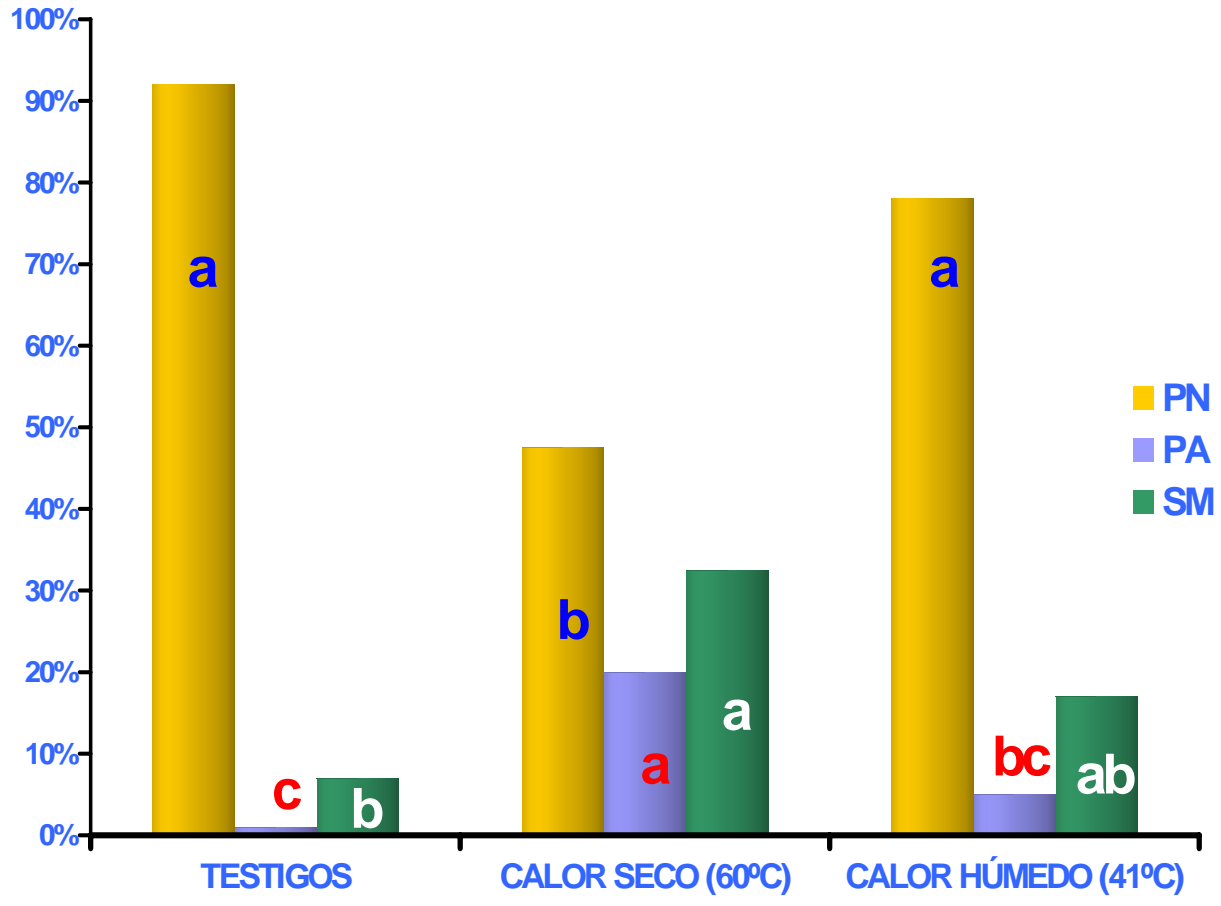
PN	90 %	82.5 %	85 %
PA	1.1 %	10 %	2.5 %
SM	8.8 %	7.5 %	12.5 %

El gráfico para la VAR-1 (San José) muestra que en Plántulas Normales (PN) los tratamientos aplicados, Calor Seco (CS) y Calor Húmedo (CH) los daños provocados no son significativos, es decir la VAR-1 tiene resistencia a estos tratamientos de envejecimiento acelerado.

Es importante tomar en cuenta estos factores, si lo que pretendemos es tener una semilla que posea una alta capacidad germinativa al momento de ser sembrada y una cosecha de alta calidad y productividad.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

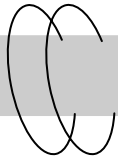
COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS PARA PN, PA Y SM DE LA VARIEDAD 2 (SAN JOSECITO)



PN	92 %	47.5 %	78 %
PA	1 %	20 %	5 %
SM	7 %	32.5 %	17 %

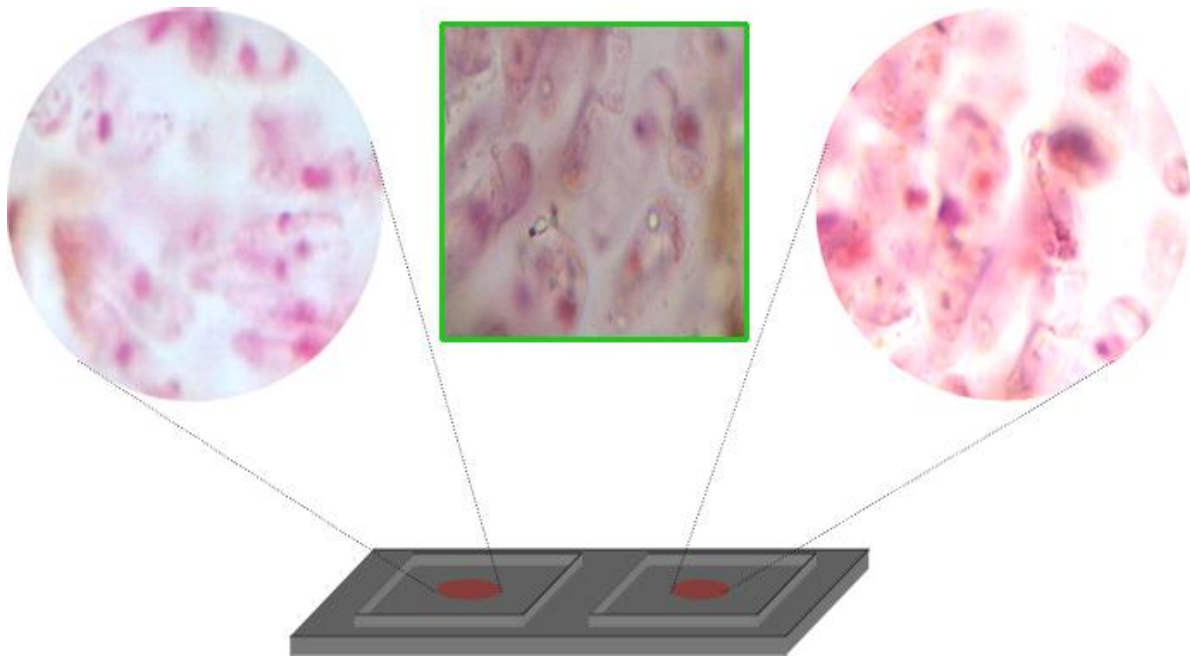
El gráfico para la VAR-2 (San Josecito) muestra que en Plántulas Normales (PN) los tratamientos aplicados, Calor Seco (CS) y Calor Húmedo (CH) los daños provocados no son significativos para CH observándose que al exponerla a temperatura extremas (CS) la disminución de PN es significativa.

Todo esto nos hace ver que el metabolismo de esta variedad se ve afectado con temperaturas elevadas resultando una semilla con una capacidad germinativa escasa.



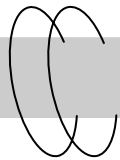
5.2. TÉCNICA DE APLASTAMIENTO O “SQUASH”

Este método (squash) nos va a permitir una rápida elaboración de preparaciones en las que se pueden contar los cromosomas, observar sus asociaciones y estudiar en detalle su estructura y morfología, análisis del ciclo celular, etc.

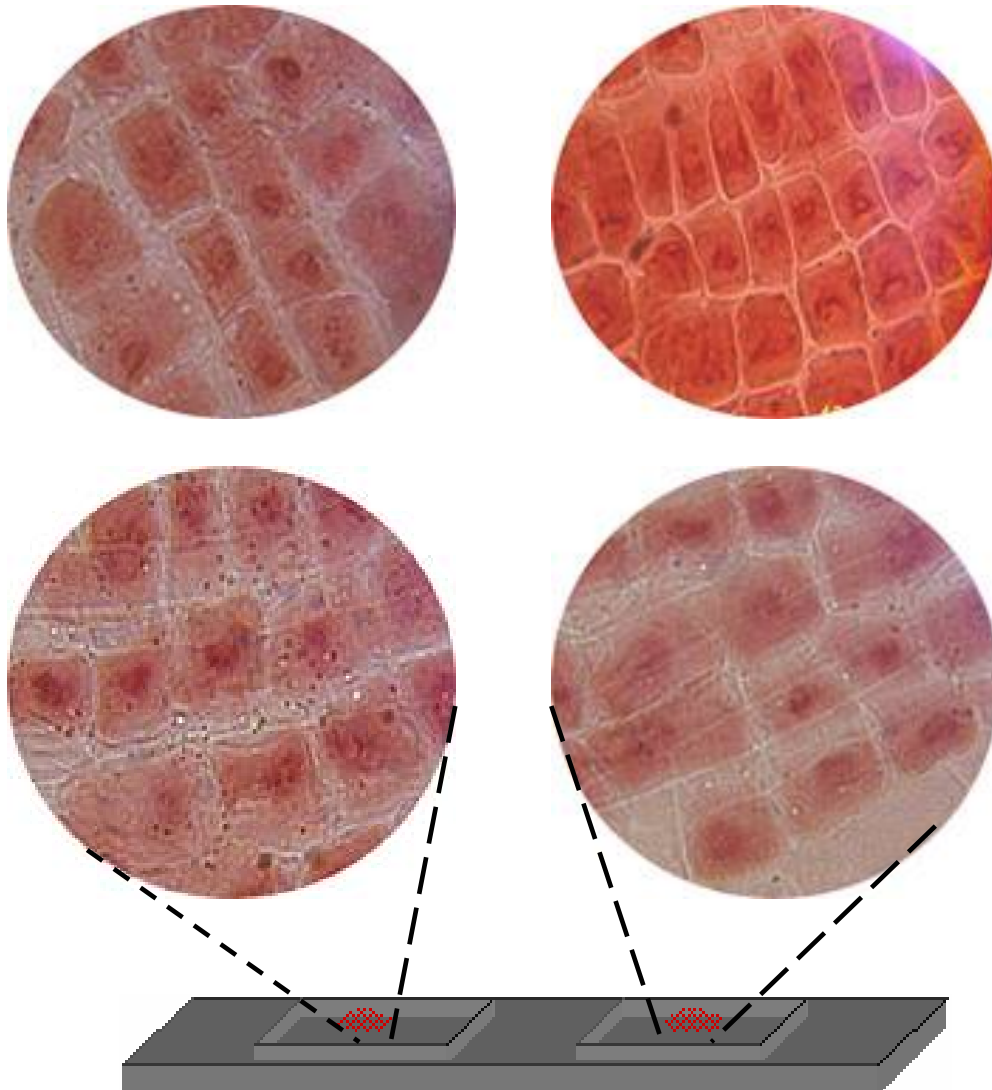


En la Fig. se pueden observar los meristemos previamente teñidos con orceína acética, estos se colocaron de uno en uno sobre portaobjetos, se le agregó una gota de ácido acético al 45% se les colocó un cubreobjetos, se golpea repetidamente sobre el cubre, justamente en la zona donde se encuentra el material y disgregándose el tejido de la raíz, hasta formar una monocapa de células.

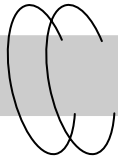
En estas imágenes podemos observar los núcleos de las células perfectamente teñidos con orceína acética, estos primeros resultados nos sirvieron para poder familiarizarnos con la técnica, para que posteriormente sea utilizada para el análisis del ciclo celular, especialmente células en mitosis las cuales analizaremos para el estudio de Índice de Cromátides hermanas.



5.3. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR (ICH)



Para el análisis del ciclo celular se tomaron 500 células las cuales con base en la evaluación cíclica para un período de 24 horas del Índice de Fase (IF) e Índice Mitótico (IM) parciales y totales se estableció que la mejor hora para la prefijación con inhibidores es a la 14 hora (IM= 16 %), presentándose un pico secundario bastante breve a la 19 hora (Fig. 13).



ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

TABLA 5

Determinación de los Índices de Fase (IF) e Índices Mitóticos (IM) totales y de la duración del ciclo celular

ESTADO	TOTAL	Interfase	Profase	Metafase	Anafase	Telofase
Frecuencia	500	374	78	2	2	44
IF %	100	74.98	15.6	0.4	0.4	8.62
IM %	25.02		15.6+	0.4+	0.4	8.62
Duración (hrs)	7 hrs	5hr,25 min	1hr,10 min	3min	3min	59min

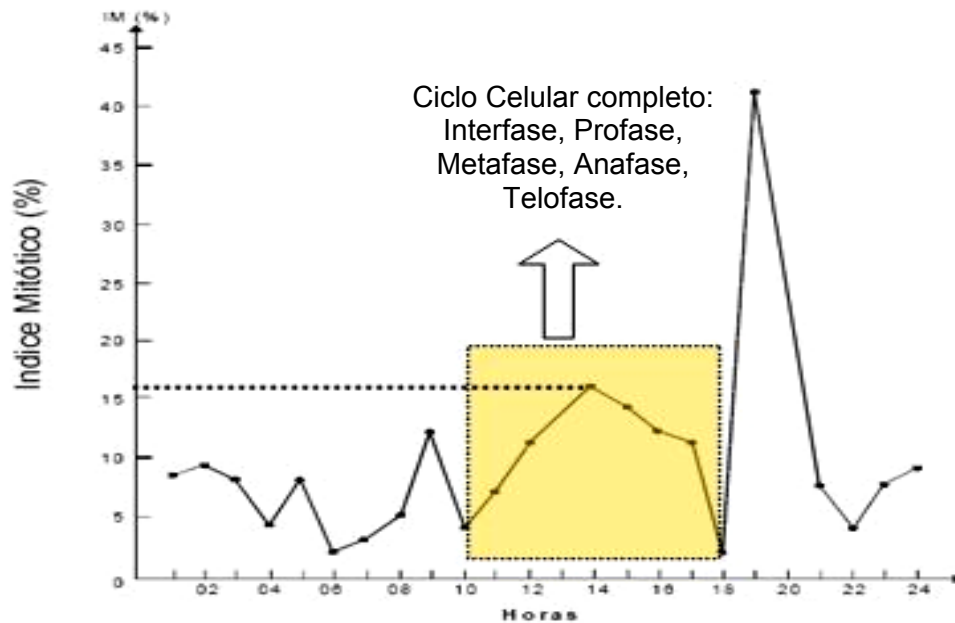
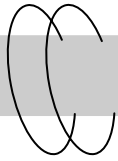


Fig. 13 Análisis del ciclo celular.

La curva del gráfico nos permite asumir un valor medio de 7 horas para un ciclo completo por lo que la duración del ciclo mitótico en base a la evaluación de los IF e IM totales, es de 2hrs 15min, de los cuales 1hr 10min son ocupados por la Profase; 3 minutos por la Metafase, 3 minutos por la Anafase y 59 minutos por la Telofase (TABLA 5). Los resultados nos indican la irregularidad del ciclo celular. La permanencia de las células en fase anterior, por lo que el material genético, luego de duplicarse en la interfase, no necesariamente se va a distribuir entre las células hijas. Como se observa en el ciclo celular no siempre termina con la división celular. Los periodos G1 y G2 no son sólo espacios de transición al período S y a la mitosis, sino también son espacios de decisión sobre si la célula continúa o no en el ciclo de la división o si se separa temporalmente o definitivamente de él.



5.4. ENSAYO COMETA.

El ensayo se realizó solo en una ocasión con semillas sin tratamiento; esto para estandarizar la técnica.

Se colocaron dos cantidades de muestra diferentes, esto para comparar con cuál de las dos se tenía mejor resultado a la hora de revelar las laminillas.

Se prepararon laminillas por duplicado (4 total), las laminillas se observaron en el microscopio de fluorescencia teniendo las siguientes imágenes.

25 μL de Muestra
50 μL de Agarosa de bajo punto de fusión

50 μL de Muestra
25 μL de Agarosa de bajo punto de fusión

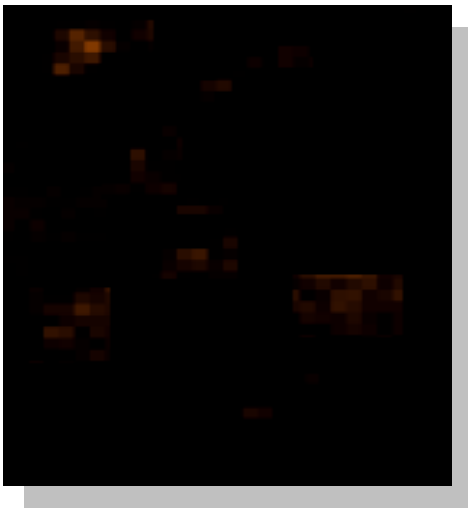


Fig. 14 25 μL de muestra

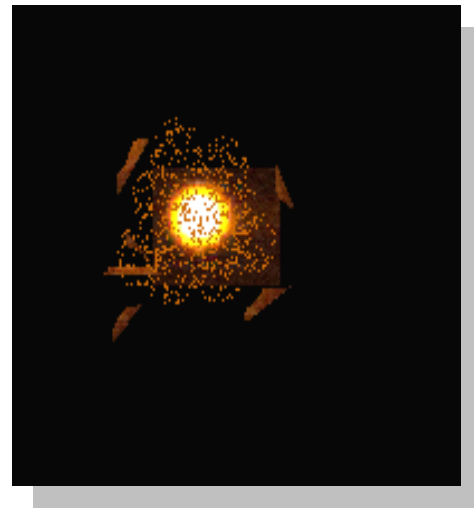
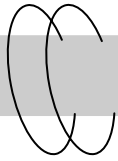


Fig. 15 50 μL de muestra

Se observa en la Fig. 14 que tenía 25 μl de muestra, no existe un resultado favorable, las laminillas revisadas no mostraron ningún núcleo teñido, solo se aprecian algunos puntos pero estos puntos pueden ser trazas del bromuro.

En la Fig. 15, donde se observaron laminillas con una mayor cantidad de muestra (50 μl) se pudo observar un núcleo perfectamente definido pero que tenía ciertas características que no son comunes para núcleos que no tienen daño en su DNA. Estos resultados podrían explicarse por las siguientes razones:

- Los núcleos no se encuentran completamente aislados.
- En la muestra además de núcleos hay restos celulares.



6. CONCLUSIONES

La simulación de daños en las semillas a nivel metabólico, por medio del envejecimiento acelerado, fue consistente y altamente confiable. Incidió sobre todos los parámetros.

Los dos tratamientos de envejecimiento artificial disminuyeron la germinación y el número de PN en la variedad 2 (San Josecito), observándose una mayor intolerancia al CS.

La variedad 1 (San José) observó una tolerancia a los tratamientos de envejecimiento acelerado al no verse disminuida la formación de PN.

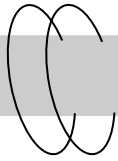
En base al % de PN, PA y SM para ambos genotipos; el tratamiento con CS es el que provoca más deterioro de las semillas.

Por lo tanto en base al % de PN la V1 (San José) fue más vigorosa que la V1 (San Josecito).

Para el análisis del ciclo celular y con base en la evaluación cíclica para un período de 24 horas del Índice de Fase (IF) e Índice Mitótico (IM) parciales y totales se estableció que la mejor hora para la prefijación con inhibidores es a la catorceava hora (14 hrs IM= 16 %) Estos resultados son de mucha utilidad para realizar el análisis del cariotipo y morfología cromosómica.

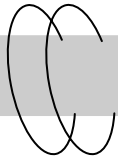
Para el ensayo cometa se observó que la estandarización de la técnica para células vegetales la cantidad de muestra debe de ser por lo menos 50 μ l, teniendo en cuenta que se necesitan por lo menos 10,000 núcleos totalmente aislados y viables.

Los procedimientos utilizados para evaluar disrupciones citogenéticas que son de difícil aplicación en células vegetales, fueron estandarizados bajo los criterios teórico-experimental con esto se pretende hacer en un trabajo posterior un análisis detallado de las disrupciones que ocurren en las horas iniciales de la germinación y continuar la investigación evaluando los rendimientos unitarios de este cultivo ya que semillas de alta calidad son esenciales para alcanzar una alta productividad.



6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Talledo, D.; C. Escobar; V. Alleman. 1993. Introducción al análisis cromosómico en vegetales. Lima, Universidad Ricardo Palma. 141 p.
- Talledo, D.; C. Escobar; V. Alleman. 1995. El ciclo celular en vegetales; su estudio, importancia y aplicaciones. *Biotempo* V:2 (2): 13-31.
- Talledo D. 1991. Caracterización cariotípica comparativa en 9 especies del género *Solanum* L. Tesis para optar el grado de Ph. D. en Biología. Universidad de la Amistad de los Pueblos. Moscú, Unión Soviética. 152 p.
- Velásquez, A. 1990. Técnicas y procedimientos de citogenética vegetal. Universidad Autónoma de Chapingo. Edo. de México. 5-9 p, 17-37 p.
- Moore, G., Devos, K.M., Wang, Z. & Gale, M.D. 1995. Cereal genome evolution: grasses, line up and form a circle. *Current Bio.*, 5: 737-739.
- Jewell, D.C. & Islam-Faridi, N. 1994. A technique for somatic chromosome preparation and C-banding of maize. In M. Freeling & Y. Walbot, eds. *The maize handbook*, p. 484-493. New York, NY, USA, Springer-Verlag.
- Longley, A.E. & Kato-Y, T.A. 1965. *Chromosome morphology of certain races of maize in Latin America*. CIMMYT Res. Bull. I.
- McClintock, B., Kato-Y, T.A. & Blumenschein, A. 1981. Chromosome constitution of the races of maize, its significance in the interpretation of relationship between races and varieties in the Americas. Chapingo, Mexico, Colegio de Postgraduados.
- Collins A.R., 2002. The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol. Biol.* 203:163-77.
- Gichner T., Mühlfeldová Z., 2002. Induced DNA damaged measured by the Comet assay in 10 weed species. *Biologia Plantarum* 43: 509-516.
- Gichner T., Patková Z., Jin Kyu Kim, 2003. DNA damage measured by the Comet assay in 8 agronomic plants. *Biologia Plantarum*, 47: 185-188.



- N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice, E. L. Schneider: A simple technique for quantitation low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184-191.
- Mendez-Natera, J. y Vergara, M. Deterioro de la capacidad de la semilla de tres híbridos de maiz (*Zae mays L.*) en función de diferentes periodos de almacenamiento en cámara de envejecimiento acelerado. Universidad de Oriente. Escuela de Ingeniería Agronómica. Departamento de Agronomía. Núcleo de monagas, Venezuela.
- Fairbairn, D.W.; Olive, P.L.; O'Neill, K.L. the comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res*, 339: 37-59: 1995.
- Olive, P.L. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol*, 75(4): 395-404: 1999.
- McDonald, M B (1998) Seed quality assessment. *Seed Sci. and Technol* 8: 265-275.
- Martínez G., A. (1995). Diseños Experimentales. Trillas. México.
- Woodstock, L.W. (1973). *Seed Sci. & Technol.* 5:709-719

**ANEXO I****PREPARACIÓN DE REACTIVOS.****ORCEÍNA ACÉTICA**

Puede prepararse (1% en ácido acético 45%) como en el caso de aceto-carmín, o bien:

2.25 gr	orceína sintética
100 ml	ácido acético glacial

Se disuelven 2.25 gr de orceína sintética en 100 ml de ácido acético glacial. Se hirve lentamente por 2 a 3 horas, se deja enfriar y luego se filtra, el filtrado se observará al microscopio y si aún tiene partículas de colorantes se volverá a filtrar hasta que la solución quede libre de ellas. Deberá almacenarse bajo refrigeración.

Para poder utilizarla se toman 4.5 ml de esta solución y se mezclan con 5.5 ml de agua destilada.

CARMÍN PROPIÓNICO

1 gr	carmín
45 ml	ácido propiónico
55 ml	agua destilada

En un frasco Erlenmeyer se ponen 45 ml de ácido propiónico más 55 ml de agua destilada se calienta hasta que se inicia la ebullición. Se retira del fuego y se agrega 1 gr de carmín, con sumo cuidado a fin de evitar un derrame. Se coloca un frasco o un embudo pequeño invertido en la boca o bien un sistema condensador y a fuego lento se deja hervir suavemente por espacio de 3 a 4 horas.

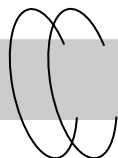
CARNOY

También conocido como Farmer o simplemente alcohol-acético.

Alcohol etílico absoluto	3 partes
Ácido acético glacial	1 parte

PECTINASA 2%

0.6 gr	pectinasa
30 ml	amortiguador de citratos

**COLCHICINA 1 %**

1	gr	colchicina
50	ml	agua destilada

Para la colchicina se utilizaron tabletas con 1 mg de la marca Soxol[®] colchicina, aproximadamente 7 tabletas con los 50 ml de agua destilada. La solución es filtrada en dos ocasiones.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA N. 1 (para la extracción de Núcleos)

Tris base pH = 7.6	50mM
Cloruro de potasio (KCl)	20mM
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)	5 mM
Sacarosa	1.2 M
Glicerol (Baker Chem.Co.)	30%
β-mercaptoetanol	1mM